

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Papel del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico y de la Senescencia en el desarrollo del Adenocarcinoma Ductal de Páncreas inducido por Oncogenes K-Ras

TESIS DOCTORAL

Carolina Navas Cuerva
Madrid, 2013

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**Papel del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico y
de la Senescencia en el desarrollo del Adenocarcinoma Ductal
de Páncreas inducido por Oncogenes K-Ras**

TESIS DOCTORAL

Carolina Navas Cuerva

Licenciada en Veterinaria

Directores: Dr. Mariano Barbacid Montalbán

Dra. Carmen Guerra González

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Madrid, 2013

CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES DE TESIS

El doctorando Carolina Navas Cuerva ha realizado su trabajo de Tesis Doctoral en el laboratorio de Oncología Experimental del Programa de Oncología Molecular en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), desde Octubre de 2008 hasta Mayo de 2013. Dicha tesis se ha realizado bajo la dirección del Dr. Mariano Barbacid Montalbán y la Dra. Carmen Guerra y la tutoría del Dr. Juan José Aragón Reyes.

DIRECTOR

Dr. Mariano Barbacid Montalbán

Investigador Principal de Oncología Experimental
(Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas)

CO-DIRECTOR

Dra. Carmen Guerra González

Investigadora Científica de Oncología Experimental
(Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas)

Agradecimientos

Llegó la hora de dar las gracias a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo apoyándome o dándome un empujón, de una manera u otra todo ayuda.

En primer lugar querría agradecer a mi director de tesis, Mariano Barbacid, (MB) la oportunidad que me dió para trabajar en su laboratorio, con espíritu crítico hace que intentemos mejorar cada vez un poco más. Jefe, tú has creado este centro y has hecho que el CNIO sea un referente de ciencia no sólo en España sino en Europa y creo que en todo el mundo, yo he tenido la suerte de ser una de las estudiantes predoctorales del fundador de este centro así que por todo esto, GRACIAS.

A mi codirectora de tesis Carmen Guerra, que siempre ha dado la cara por mi desde el principio, cuando yo estaba en una situación difícil dentro del CNIO siempre me apoyaste pero lo más importante es que todavía después de 5 años lo sigues haciendo como el primer día o incluso más si cabe. Gracias a ti, he podido trabajar en uno de los mejores proyectos del laboratorio, tú me has dado siempre total libertad pero con la tranquilidad de saber que siempre iba a encontrar la puerta de tu despacho abierta. Me diste la oportunidad de trabajar en Oncología Experimental, en el proyecto de “Páncreas” y eso ha hecho que vengan más y más oportunidades. Pero el laboratorio no es sólo ciencia, así que en el plano personal tú me has enseñado que siempre hay que luchar por las injusticias, que el no ya lo tenemos, incluso me has enseñado un idioma....el mcgliano. Por todo esto, y sobretodo por estos 5 años de ser mi directora de tesis, muchas gracias.

Después de las formalidades me gustaría seguir por orden profesional-cronológico. Así que quiero agradecer a mis profesoras de la Facultad de Veterinaria de la UCM: Cristina Novoa y Ximena Pickering, gracias por confiar en mi, ser mis tutoras en mi primer trabajo científico y por querer serlo otro año más.

Gracias a Isabel Blanco, que por casualidad me presentó a Marta Cañamero que me llevó a Carmen Guerra, así empezó todo en 2008, gracias

por confiar en mi, sin vosotras hoy no estaría en este laboratorio y tampoco habría podido realizar este trabajo.

Muchísimas gracias a todos los Ex-OE, a Javier Galán no te conocí trabajando en el labo, pero te he conocido fuera y creo que te conocí mucho más el año pasado durante la escritura del paper, donde me di cuenta que eres un amigo, alguien que te escucha, te anima, se preocupa por ti y te intenta echar un cable cuando lo necesitas, muchísimas gracias, espero que podamos organizar más Cajun Ribs. A Antonio Cerqueira me encanta celebrar contigo en la distancia tus nuevos puestos de trabajo, todo lo que nos mandas está buenísimo. Marta Puyol, muchas gracias por ayudarme en el labo, en los primeros momentos, cuando más perdida estaba, gracias por aportar ideas, por perder tu tiempo ayudándome a hacer los experimentos en cultivos cuando tú estabas superliada escribiendo la tesis. A Jelena, porque sin conocerme mucho quisiste ser mi amiga, por seguir la relación, escribiendo mails ahora que estás fuera, por quedar cuando vienes a Madrid o cuando nos vamos de congreso a San Francisco, por ayudarme incluso con la búsqueda de miembros del tribunal. A Miquelín muchas gracias por ser mi compi de sitio de estudiar, de verdad que te admiro, el hombre highthrogtpout del labo no sólo trabajando sino pensando que eso es lo más difícil. A Schumy, tú me ayudaste a empezar en el labo, me enseñaste a pinchar los ratones, ¿te acuerdas cuando me apagabas la luz del pasillo de barrera y me asustabas?. A Rafita, que raro suena decir esto pero ya no estás en el labo ahora a quien le voy a preguntar cuánto pesa pERK, desde que no estás los colchoneros no se meten tanto conmigo. A Fabio, coleguita te echo de menos en el labo, ahora quién me da el punto de vista masculino de la situación, espero que nos sigamos viendo como hasta ahora y cuida a Cecilia, hacéis una de las mejores parejas. A todos los estudiantes que han trabajado conmigo desde los primeros, Álvaro y Patricia, a Rocío (sé que vas a ser la mejor enfermera), a mi primer estudiante de estancias gracias Stefan por esas conversaciones en cultivos, por enseñarme Lavapiés aunque no lo creas yo contigo aprendí que tengo que limar mi genio, me enseñaste a tener un poco más de paciencia porque parecía que se me había olvidado lo difícil que es empezar y lo fácil que es equivocarse cuando empiezas. A mis summer student Ricardo y Cristina, fuisteis mi primera

responsabilidad, sé que es difícil ser estudiante (llevo mucho tiempo siéndolo) pero tener a alguien a tu cargo es más complicado aún y dos ni os cuento.

A los que estáis ahora dentro de OE, empiezo por sitios como cuando escribo los mails no se me vaya a olvidar alguien... Malaguita (Lucía Simón) gracias por enseñarme que existe un año cero de tesis, por ser mi manager muchas veces, eres la mejor perro flauta del mundo aunque ya sabes que para mi en el fondo tienes tu puntito de pija....

Magdy te escribo en español para que empieces a soltarte en el idioma de tu familia política, empezaste siendo la novia de Rafa, y poco a poco nos hemos ido conociendo, siempre has tenido en cuenta mis opiniones, así que eso es que confías en mi o que a lo mejor me ves más vieja. Harrys the new man in the lab, thank you for be so brave to come a girls' lab. Bea, gracias por traerme esos tumores que ponemos en cultivos.

Sarah que te voy a decir, hemos compartido muchas cosas buenas, malas, momentos de agobio, momentos de risas, fiestas, cafés, cervezas, Nocheviejas con la familia como lo llamas tú, sé que a veces nos hemos enfadado pero también hemos sabido reconocer nuestros errores y eso es lo más importante. Eres más que una amiga no sólo para mi sino para toda mi familia, gracias por estar siempre ahí no me has fallado nunca y eso es algo que se puede decir de muy poca gente. Y ya sabes que cuando yo digo algo es porque lo sé.

Mathias mi compañero back to back muchísimas gracias por contestarme siempre cuando te digo Mathias te puedo hacer una pregunta, creo que eres mejor que un SnapShot de Cell, ¿te sabes todos los pathways del mundo y los crosstalk!, muchas gracias, por ayudarme a buscar postdoc, por hablar conmigo de futbol porque desde que se ha ido Rafa, en el labo ya casi no se habla. Mónica la nueva incorporación al labo, ya me caías bien cuando estabas con Hidalgo pero es que ahora me caes mucho mejor, estás un poco pirada pero ahí está la gracia y como dice Sarah ¿quién es normal?, gracias por animarme todos los días, por escuchar mis penas. Gracias por ser tan

crítica, por decir siempre lo que piensas o aunque no lo digas lo dejas ver (o al menos yo lo veo).

¿Quién es la siguiente a la que tengo que agradecer muchas cosas? A la más nueva, a la que ahora está en su año cero de tesis, siiiii Señorita Teresa aunque hayas venido en un momento en el que ando muy liada, (no quiero utilizar la expresión que normalmente digo) y no te he podido hacer todo el caso que te mereces pero eres una chica de lo más espabilada y enseguida te has adaptado a mis horarios raros de ponernos a hacer experimentos o de empezar con uno y “en el mientras tanto” seguir con la mitad de otro. Gracias por tener tanta paciencia conmigo, muchas gracias por ser tan positiva, siempre me dices: “seguro que se soluciona”. Que suerte tiene Carmen de tenerte como estudiante.

Cathey, muchísimas gracias por corregirme todo el inglés de todos los documentos, de todas las presentaciones para los Progress, las entrevistas, los mails y un largo etc. Muchas gracias por traer los muffins de calabacín los fines de semana, no sabes cuanto animan y también por el sábado que me obligaste a salir, no me apetecía pero gracias a ti conocí a gente estupenda, Perla, Chloe, Nadia y sobretodo porque ese día conocí a Luis.

Gabachita, Emilie muchas gracias por toda tu ayuda en el end-note, por tu experiencia, siempre me dices sí esto me acuerdo que me pasó a mi durante la tesis, y acuérdate que el próximo año tenemos que ir juntas a ver ganar a Nadal en Roland Garros.

Sara Mainardi, siempre te llamo así, muchas gracias por ayudarme desde el principio, te acuerdas ese día de agobio con la doxi en barrera, me ayudaste a cambiar los biberones para que subiera al labo a terminar las cosas, no eran tus ratones, ni era tu proyecto pero me ayudaste como si lo fueran. El congreso en San Francisco que bien lo pasamos, no reímos un montón y también nos conocimos mucho mejor.

Los del despacho: David, el más colchonero del labo, aunque últimamente tenemos un pacto de no agresión. Gracias por tus comentarios en los labmeeting siempre es bueno tener una visión de fuera de páncreas pero tengo una duda ¿algún día te harás una foto conmigo con una camiseta del Madrid?. Chiara, muchas gracias por tus regalos para que me dieran suerte en las charlas, por irme a ver al hospital cuando estuve malita, y por tus tiramisú, tus bizcochos siempre que voy al despacho y veo que has cocinado mi estómago y yo te lo agradecemos un montón. Patrichuli!!!!!!! Que te voy a decir palentina, te tengo que agradecer como eres: eres muy buena amiga, siempre te estás riendo, eres muy positiva, conoces a todo el mundo, siempre tienes tiempo para un café, y siempre cuando no veo más allá o todo lo veo negro me dices a ver Carolita...Y no solo yo te tengo que agradecer, sino el labo entero, ya que gracias a ti tenemos la expresión a que mando un amo pobre... Raquel, la madraza más joven del labo, quería agradecerte tus frases de ánimo, siempre me dices esto se pasa!!, todo llega,...

Javier muchas gracias por venir a mis ensayos de charlas, por venir a mis labmeeting, por contestar el teléfono siempre que he necesitado preguntarte una duda médica o un enchufe en el hospital.

Mis tres chicas, SanRo, millones de gracias por tener esa memoria y decir, sí Carol esto ya lo pedimos, o sí llegó ayer o pregunta en este labo que lo han pedido. Lechuga, para mi eres la master en cultivos, no hay nadie que sepa mejor que tú como trabajar en cultivos, gracias por enseñarme a poner a punto los protocolos, gracias por preocuparte de mis problemas en cultivos como si fueran tuyos, aunque sé que no te gustan mis células te alegraste como la que más cuando tuvimos el primer ducto en la transdiferenciación y muchas gracias también por enseñarme que a veces en la vida hay que ser un poco sordo. Rasky ahora en verano te echamos de menos en la comida, ya sabemos que no te gusta mucho el sol, un millón de gracias por buscar siempre los protocolos conmigo, por dejar de hacer tus cosas y darme un control wild type, wild type que funcione bien ¿cuántos microlitros? Y sobretodo por entenderme tantas y tantas veces. Y por último que no por eso menos importante quería dar las gracias a Alguien y a Nadie no sabemos si trabajan

juntos pero cuando uno no está trabaja el otro. Ninguno del labo sabemos donde se sientan pero si sabemos que trabajan con nosotros porque son los que se gastan los últimos geles, se dejan sucias las campanas, se acaban los anticuerpos o los reactivos para la PCR cuantitativas, sin ellos no tendríamos la frase de “a que mando un amo pobre” y gracias a ellos ya tenemos culpables cuando pasan todas esas cosas en el labo.

A todas las personas que aunque no formen parte del labo han hecho posible, que llegue hasta aquí. María Lozano, cuántas horas hemos pasado delante del microdisector, cogiendo células azulitas (verdes) y poniendo a punto protocolos de extracción, PCRs, viendo inmunofluorescencias, gracias a todo eso no sólo tengo datos, protocolos, técnicas puestas a punto sino que tengo una gran amiga aunque tenemos los mismos años en muchas cosas pareces mi hermana mayor, eres la persona con más mano izquierda del mundo, y mira que estos años juntas he intentado aprender eso de ti, pero creo que necesito practicar más. A Lydia la jefa de María y de la Unidad Histología muchas gracias por estar siempre dispuesta a ayudar en todo lo que he necesitado y lo más importante por hacerlo siempre con una sonrisa.

A nuestros técnicos del animalario, Mayte, Isabel Aragón, Isabel Agudo que ahora no solo se encargan de poner los cruces, destetar, sacar ratones cuando los necesitamos vigilar que no se pongan malitos, sin vosotras este trabajo sería imposible. Y a aquellas técnicas que aunque no forman parte del labo siempre te hacían el día mas entretenido cuando bajabas a pinchar la ceru y a cambiar la doxi, Esme, Vicky, muchas gracias.

A nuestras chicas de patología comparada, gracias por hacer los miles de bloques, los cortes, las H&E, muchas inmunos, ¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡muchísimas gracias!!!!!!!!!!

Paloma, muchas gracias por toda la ayuda en los envíos, por darme el puntero cuando voy a hacer una presentación y desearme suerte, por ayudarme a preparar los viajes, en fin por ser más que la secretaria de Oncología Molecular. Celeste, muchas gracias por recordarnos que llegan las 6

de la tarde, que hay vida fuera del laboratorio, que nuestros padres nos están esperando en casa o nuestro novio... Muchas gracias a nuestros chicos de mantenimiento Jesús y Luis por arreglarnos todo para que podamos seguir trabajando. Muchas gracias a Jaime y a Jorge, siempre me arregláis el ordenador super rápido, da igual el día de la semana, la hora.

Muchas gracias Tamara, por escucharme siempre, por escribirme mails que me alegran el día o que me ayudan a pensar que no es tan malo lo que me pasa, que tiene solución, por darme otro punto de vista, por ser mi compañera de juergas, de risas, de llantos, por ser como mi hermana.

Luis, has llegado cuando no te esperaba y no quiero que te vayas nunca. Van a tener razón que el amor de tu vida aparece cuando no lo buscas. Muchas gracias por estar a mi lado y aguantarme el ser a veces “desproporcionada”, ya sabes que es porque estoy escribiendo la tesis. Aunque te advertí que era borde, has querido estar a mi lado y espero que ese empeño no lo pierdas. Eres mejor que lo que yo imaginaba tener. Me animas, me apoyas, me mimas, me cuidas, estás a mi lado, eres más que un novio, eres mi compañero y, yo tu compañera (como tú me llamas) y espero seguir siéndolo toda la vida si tu quieres. No sé si te lo he dicho pero junto con mis padres eres la persona más importante en mi vida. Te quiero.

Muchas gracias a toda mi familia, a la Maina muchas gracias por llevarme al cole, por irme a recoger, por pasar los veranos conmigo, a la Ñeña que me hace reír contándome chistes, a mi Bimba, por ocupar mi sitio en el sofá y en casa ahora que ya no estoy, a Esperancita, Jose (los que yo considero que son mis tíos), a mis primas Rebe y a Tamara, bueno ahora Jaime y Tamara, todos os habéis preocupado e interesado siempre por mi, así que muchísimas gracias porque sé que puedo contar con vosotros, pero me gustaría dar las gracias de manera especial a parte de mi familia que ahora no está pero que me acuerdo todos los días de ellos y sin ellos el llegar hasta aquí no hubiera sido posible. A mi abuelo, a mi primo los dos os fuisteis muy pronto. Al Vito gracias a ti aprendí a jugar al ajedrez, al mus (a hacer trampas al mus), a la Tata Mimi que rico todas las comidas que me hacías ojalá hubiera

aprendido de ti a cocinar, a la Tata Mary por estar siempre a mi lado sobretodo aquel verano cuando trabajé en la clínica en La Latina, a la abuela Encarna, por dejarme siempre una sorpresa en mi cajón todos los domingos. Tiochi, gracias a ti he tenido muchas cosas, la Gusi me la compraron por ti y creo que también hice veterinaria por ti para que tuvieras los mejores perros y siempre los tuvieras vacunados, a la Tiacon, dicen que me parezco a ti en el carácter y también cuando me quedo mirando la tele. Gracias a todos por ser mi familia y por quererme tanto.

En último lugar quiero dar las gracias a las personas que me han dado la vida, y lo más importante, me habéis acompañado toda la vida, mis padres.

Mo muchas gracias por enseñarme a sumar, a restar, ¿te acuerdas del profesor Mochuelo?, por explicarme matemáticas cuando no las entendía, muchas gracias por pasar todas las tardes a mi lado preguntándome la lección incluso hasta en 5º de carrera, por montarte conmigo en el coche cuando me saqué el carné de conducir... Siento mucho que a veces nos enfademos, mamá dice que nos pasa eso porque somos iguales y eso espero porque me encantaría ser como tú. Para mí, el mejor premio es que tú te sientas orgulloso de mi.

Ma, tú me diste la vida y has estado siempre a mi lado. Muchas gracias por estar conmigo en el hospital cuando era pequeñita, no te separaste ni un día. Muchas gracias por animarme a conseguir lo que quería, tú siempre me dices que hay que esforzarse, pero sobretodo gracias porque cuando no me quedan fuerzas tu eres mi apoyo, eres la que me das esas fuerzas para seguir adelante, y muchas gracias también por decirme cosas que aunque me hayan dolido las necesitaba para darme cuenta de lo que estaba pasando. Muchas gracias por acompañarme en Japón. Todo lo que soy es por vosotros y os lo debo a vosotros. Empezar la tesis, estar en este labo, el paper, la tesis, sin vuestra ayuda, apoyo y fuerzas no hubiera sido posible. Os quiero mucho.

Resumen

Resumen:

Las células acinares de ratones que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} desde estadios embrionarios E16.5 son capaces de transformarse y dan lugar a lesiones PanIN. Las lesiones PanIN de bajo grado expresan marcadores típicos de senescencia (p16 y SABG). Esto implica que no progresen a estadios más agresivos. Además, la expresión de marcadores de senescencia correlacionan inversamente con el marcador de proliferación celular (Ki67). Por el contrario, las células acinares de animales adultos son resistentes a la transformación por el oncogén *K-Ras*^{G12V} incluso, en ausencia de supresores tumorales como *p16Ink4a/p19Arf* o *p53*. Para que las células acinares de animales adultos se transformen por el oncogén *K-Ras*^{G12V} y den lugar a lesiones PanIN es necesaria la presencia de la pancreatitis crónica. La pancreatitis contribuye a la progresión de las lesiones, ya que, es capaz de superar la barrera de senescencia presente en las lesiones PanIN de bajo grado. Pero esto es un proceso reversible ya que, la atenuación de la inflamación, que induce la pancreatitis acelera la reparación del tejido y reduce la progresión de las lesiones PanIN. Lo mismo ocurre en pacientes. Las lesiones PanIN presentes en pacientes con pancreatitis crónica, que han recibido tratamiento antiinflamatorio, expresan marcadores de senescencia. Sugiriendo por tanto, que el tratamiento antiinflamatorio en este tipo de pacientes reduce el riesgo para el desarrollo de tumores de páncreas.

Las mutaciones de EGFR y K-Ras son mutuamente excluyentes en NSCLC (Tumor de Pulmón de Células No Pequeñas) sugiriendo que ambas podrían señalar a través de la misma vía. Sin embargo, la eliminación genética de *Egfr* en células acinares previene el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC inducidas por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}. Nuestros resultados demuestran que *Egfr* es esencial para la transdiferenciación acino-ductal inducidos por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} en células acinares. Además, en células acinares adultas que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} en el contexto de la pancreatitis la expresión de *Egfr* es también esencial para el desarrollo de lesiones PanIN y tumores de páncreas. Incluso en ausencia de *p16Ink4a/p19Arf*. Sólo la pérdida de *p53* hace que los tumores inducidos por la presencia del oncogén *K-Ras*^{G12V} sean independientes de *Egfr*, sin embargo existe un retraso en la aparición de tumores incrementándose por tanto la media de supervivencia de los ratones. Estudios *in vitro* con líneas celulares procedentes de explantes tumorales de ratón en los que se ha delecionado *p53* y *Egfr* nos indican que la inhibición combinada de las vías de PI3K y STAT3 disminuye considerablemente la tasa de proliferación. Estos resultados sugieren que es necesario la inhibición de al menos 4 vías de señalización diferentes para que el tratamiento de los tumores de páncreas sea efectivo.

Summary

Summary:

The presence of the endogenous *K-Ras*^{G12V} oncogene in embryonic acinar cells results in pancreatic PanIN lesions and invasive PDAC. Low-grade lesions, are positive for senescence markers such as SABG and p16 which fail to progress to PDAC, suggesting that senescence can inhibit PanIN progression to PDAC. Moreover, the senescence markers inversely correlate with proliferation markers, such as Ki67. However, pancreatic acinar cells from adult mice are resistant to transformation by some of the most robust oncogenic insults including expression of *K-Ras*^{G12V} oncogene and loss of *p16Ink4a/p19Arf* or *p53* tumor suppressors. Yet, these acinar cells yield pancreatic PanIN and PDAC if exposed to limited bouts of non-acute pancreatitis, providing they harbor the K-Ras oncogene. Pancreatitis contributes to tumor progression by abrogating the senescence barrier, characteristic of low-grade PanINs. This is a reversible process, therefore, attenuation of pancreatitis-induced inflammation also accelerates tissue repair and thwarts PanIN expansion. Similarly, patients with chronic pancreatitis display senescent PanINs if they have received anti-inflammatory drugs. These results suggest that anti-inflammatory treatment of patients diagnosed with pancreatitis may reduce their risk of developing PDAC.

Egfr and *K-Ras* mutations are mutually exclusive in NSCLC and in CRC, suggesting that they act in the same signaling pathway. However, ablation of *Egfr* in pancreatic acinar cells completely prevents development of *K-Ras* oncogene-driven preneoplastic PanIN lesions and PDAC tumors. *Egfr* expression is also essential for PanIN and PDAC development in the context of chronic pancreatitis and in the absence of *p16Ink4a/p19Arf* tumor suppressors. Only loss of *p53* made *K-Ras* oncogene-driven PDAC tumors independent of *Egfr*, although tumor latency and survival were considerably increased in the absence of *Egfr*. Combined inhibition of PI3K and Stat3 signaling pathways effectively prevents proliferation of explants derived from *p53* and *Egfr*-deficient PDAC tumors. Thus, suggesting that loss of *p53* may activate these pathways in an *Egfr*-independent manner. These findings suggest that effective treatment of PDAC tumors may require concomitant inhibition of at least four different signaling pathways.

Índice

Agradecimientos.....	i
Resumen.....	ii
Summary.....	iii
 1.- ÍNDICE.....	 1
 2.- ABREVIATURAS	 7
 3.- INTRODUCCIÓN	 11
3.1 Epidemiología del adeocarcinoma de páncreas	13
3.2 Anatomía del páncreas	15
3.3 Célula de origen y estadíos de desarrollo del adenocarcinoma pancreático ductal	
3.4 Genética molecular del cáncer de páncreas	19
3.4.1 Oncogenes.....	19
3.4.2 Genes supresores de tumores (<i>p16/CDKN2A</i> , <i>P53</i> y <i>DPC4/SMAD4</i>)	20
3.4.3 Acortamiento de los telómeros	21
3.4.4 Rutas de señalización implicadas en el desarrollo, Hedgehog y Notch.....	21
3.4.5 Matriz extracelular y estroma	22
3.4.6 Factores de crecimiento	23
3.5 EGFR.....	24
3.5.1 Principales vías de señalización de EGFR.....	24
3.5.2 EGFR en cáncer	26
3.5.3 Inhibidores de EGFR	29
3.6 Modelos murinos para el estudio del papel del oncogén <i>K-Ras</i> en el desarrollo tumoral de páncreas, pulmón e intestino	30
 4.- OBJETIVOS	 35
 5.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	 39
5.1 Líneas de ratón genéticamente modificadas empleadas en este trabajo	41
5.2 Estabulación y experimentación	41
5.3 Tratamientos de los animales	42
5.3.1 Administración de doxiciclina y ceruleína	42
5.3.2 Administración de 4-Hidroxitamoxifen (4-OHT).....	44

5.3.3 Tratamiento con Erlotinib	44
5.3.4 Tratamiento con Sulindac	44
5.4 Extracción de ADN y genotipado del ratón	45
5.4.1 Genotipado por PCR.....	45
5.5 Histopatología e Inmunohistoquímica	47
5.5.1 Obtención de muestras.....	47
5.5.2 Tinción X-gal en cortes de criostato	47
5.5.3 Tinción de senescencia asociada a β -galactosidasa (SABG)	48
5.5.4 Tinciones de X-gal de explantes celulares y de células embebidas en colágeno.....	48
5.5.5 Tinciones de hematoxilina/eosina e inmunohistoquímica	49
5.6. Microdissección por láser y análisis por PCR de la delección de EGFR.....	50
5.6.1 En muestras de OCT	50
5.6.2 En lesiones de muestras de parafina	51
5.7 Cultivos celulares.....	52
5.7.1 Ensayos de transdiferenciación celular	52
5.7.2 Obtención de explantes de adenocarcinomas pancreáticos de ratón	53
5.7.3 Líneas tumorales humanas utilizadas	54
5.7.4 Transfecciones e infecciones lentivirales	54
5.7.5 Ensayos de proliferación celular.....	55
5.7.6 Tratamiento con inhibidores de las líneas celulares	56
5.8 Análisis de proteínas.....	58
5.8.1 Extracción y cuantificación de proteínas	58
5.8.2 Western Blot	58
5.8.3 Extracción de ARN total.....	59
5.8.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	59
5.8.5 Reacciones de PCR a tiempo real (RT-PCT) con SYBR Green I	60
5.9 Estadística.....	61
6.- RESULTADOS	63
6.1 Estudio de los fenómenos de senescencia.....	65
6.1.1 El fenómeno de senescencia aparece en las lesiones PanIN de bajo grado	65
6.2 Papel del supresor tumoral <i>p16Ink4a</i> y de la pancreatitis en el desarrollo tumoral....	68
6.2.1 La pancreatitis contribuye al desarrollo de lesiones PanIN debido a la inhibición de la senescencia inducida por oncogenes	68
6.2.2 El tratamiento con antiinflamatorios retrasa la aparición de lesiones provocadas por la pancreatitis y revierte el daño tisular	70

6.2.3 La inflamación inducida por la pancreatitis bloquea la senescencia en lesiones preneoplásicas (PanIN) de pacientes	72
6.3 Papel de <i>Egfr</i> en la iniciación tumoral inducido por la expresión del oncogén <i>K-Ras</i>^{G12V} y su posible uso terapéutico.....	74
6.3.1 Expresión de EGFR en lesiones pancreáticas (PanIN) y PDAC en muestras humanas y de ratón	74
6.3.2 La transdiferenciación acino-ductal en presencia del oncogén <i>K-Ras</i> requiere la señalización a través de EGFR	77
6.3.3 La señalización de <i>Egfr</i> es esencial para la transdiferenciación acino-ductal <i>in vitro</i> en ausencia p16/p19 pero no en ausencia de p53.....	79
6.3.4 EGFR es esencial para el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC inducidas por la expresión del oncogén <i>K-Ras</i>	81
6.3.5 <i>Egfr</i> también es esencial para el desarrollo de tumores, en el protocolo adulto	83
6.3.6 <i>Egfr</i> coopera con el oncogén <i>K-Ras</i> activando la vía de señalización de Akt y Stat3	84
6.3.7 Las Líneas celulares humanas de PDAC son dependientes de la señalización de EGFR pero no del oncogén <i>K-Ras</i>	86
6.3.8 <i>Egfr</i> no es esencial para el desarrollo de lesiones tumorales en intestino, ni en pulmón inducidas por la expresión del oncogén <i>K-Ras</i>	88
6.3.9 La pérdida de senescencia no anula la necesidad de la señalización a través de EGFR durante el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC	90
6.3.10 La pérdida de <i>p53</i> provoca la activación de otras vías de señalización independientes de <i>Egfr</i>	92
6.3.11 La inhibición de la señalización de EGFR mediante Erlotinib interfiere en el desarrollo de PDAC <i>in vivo</i>	94
6.3.12 La señalización de <i>Egfr</i> es necesaria para la proliferación de los explantes tumorales procedentes de PDAC de ratón	96
6.3.13 Cooperación de la señalización de PI3K y Stat3 en ausencia de <i>Egfr</i>	98
7.- DISCUSIÓN.....	101
7.1 Estudio de los fenómenos de senescencia.....	105
7.1.1 La pancreatitis contribuye al desarrollo de lesiones PanIN debido a la inhibición de la senescencia inducida por oncogenes la inhibición de la senescencia inducida por oncogenes.....	106
7.1.2 La inflamación inducida por la pancreatitis bloquea la senescencia en lesiones preneoplásicas (PanIN) de pacientes.....	107

7.2 Papel del Egfr en el desarrollo de tumores pancreáticos inducidos por el oncogén <i>K-Ras</i>^{G12V}	109
7.2.1 La expresión de EGFR es necesaria en todos los estadios de la progresión tumoral de páncreas	109
7.2.2 Egfr es esencial para el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC inducidas por la expresión del oncogén <i>K-Ras</i> tanto en el protocolo embrionario como en el adulto en presencia ceruleína	110
7.2.3 Egfr es esencial para el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC inducidas por la expresión del oncogén <i>K-Ras</i> en ausencia de p16/p19. En cambio, la pérdida de p53 provoca la activación de otras vías independientes de Egfr	111
8- CONCLUSIONES	119
9.- BIBLIOGRAFÍA	123
10.- ANEXOS	147

Abreviaturas

2.- Abreviaturas

ADM:	<i>Acinar Ductal Metaplasia</i> . Metaplasia acino-ductal.
β -gal:	β -galactosidasa.
β -geo:	β -galactosidasa / neomicina.
CAF:	<i>Cancer Associated Fibroblast</i>
Cdks:	<i>Cycline dependent kinases</i> . Quinasas dependientes de ciclinas.
DAG:	Diacylglycerol .
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> . Medio mínimo esencial de Dulbecco.
EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i> . Factor de Crecimiento Epidérmico.
EGFR:	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> . Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.
Erk:	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> . Quinasas reguladas por señales extracelulares.
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i> . Suero Bovino Fetal.
GAP:	<i>GTPase-Activating Protein</i> . Proteína Activadora de la GTPasa.
GDP:	<i>Guanosine diphosphate</i> . Guanosin difosfato.
GEF:	<i>Guanine nucleotide Exchange-Factor</i> . Factor de Intercambio de nucleótidos de Guanina.
GEMM:	<i>Genetic Engenired Mouse Model</i> . Modelos de Ratón Genéticamente Modificados.
GFP:	<i>Green Fluorescent Protein</i> . Proteína Verde Fluorescente
GTP:	<i>Guanosine triphosphate</i> . Guanosin trifosfato.
HB-EGF:	<i>Heparine Binding EGF</i> .
HBSS:	<i>Hank's Balance Salt Solution</i>
H&E:	Hematoxiline & Eosine . Hematoxilina y Eosina.
IC ₅₀₋₉₀ :	Half Maximal Inhibitory Concentration . Ninety percent Inhibitory Concentration.
IPMN:	<i>Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm</i> . Neoplasia Pancreática Intraductal Mucionosa.
IP ₃ :	<i>Inositol-1, 4, 5-Triphosphate</i> . Inositol-1, 4, 5-Trifosfato.
IRES:	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i> . Sitio interno de entrada del ribosoma.
Mapk:	Mitogen-activated protein kinases . Proteína quinasas activadas por mitógenos.
MCN:	<i>Mucinous Cystic Neplasm</i> . Neoplasia Cística Mucinosa

2.- Abreviaturas

Mek:	<i>Map Erk Kinase</i> . Quinasa estimulada por mitógenos de Erk.
MEFs:	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> . Fibroblastos embrionarios de ratón.
mTOR:	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> . Diana de la Rapamicina de mamíferos.
MTT:	3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide
NSCLC: Pequeñas.	<i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i> . Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas.
4-OHT:	4-hidroxitamoxifeno.
PanIN: <i>Intraepithelial</i> .	<i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i> . <i>Neoplasia Pancreática Intraepithelial</i> .
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PDAC: Páncreas	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i> . Adenocarcinoma Ductal de Páncreas
PDGFR:	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i> . Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
PDK1:	<i>Phosphatidylinositol-Dependent Kinase-1</i> . Quinasa Dependiente de Fosfatidilinositol-1.
PIP ₂ :	<i>Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate</i> . Fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato.
PIP ₃ :	<i>Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate</i> . Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato.
PI3K:	<i>Phosphoinositol-3-Kinase</i> . Fosfoinositol-3-Quinasa.
PKA:	<i>Protein Kinase A</i> . Proteína Quinasa A.
PKB:	<i>Protein Kinase B</i> . Proteína Quinasa B.
PKC:	<i>Protein Kinase C</i> . Proteína Quinasa C.
PLC ϵ :	<i>Phospholipase Cϵ</i> . Fosfolipasa C ϵ .
PP1:	<i>Proteinphosphatase 1</i> . Proteínafosfatasa 1
PP2A:	<i>Proteinphosphatase 2A</i> . Proteínafosfatasa 2A.
RalGDS:	<i>Ral Guanine nucleotide-Dissociation Stimulator</i> . Estimulador de la Disociación de los nucleótidos de Guanina de Ral.
RBD:	<i>Ras Binding Domain</i> . Dominio de Unión a Ras.
RTK:	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i> . Receptor Tirosina Quinasa.
SABG:	<i>Senescence Associated β Galactosidase</i> . Senescencia Asociada a β Galactosidasa
SPARC:	<i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</i> .
TGF α :	<i>Transforming Growth Factor</i> . Factor de Crecimiento transformante

Introducción

3.- Introducción

El adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC), aunque ocupa el décimo lugar en cuanto a incidencia es la cuarta causa de muerte por cáncer en los países Occidentales (Figura 1) con una media de supervivencia de menos de 6 meses tras el diagnóstico (157). A pesar de los esfuerzos clínicos y científicos, el pronóstico de esta enfermedad no ha mejorado significativamente en las últimas décadas, ya que esta enfermedad presenta signos inespecíficos que dificultan su diagnóstico en las etapas iniciales.

Whipple y colaboradores realizaron la primera pancreatoduodenoectomía en 1935 y hasta ahora la cirugía sigue siendo el mejor tratamiento. Sólo el 20% de los pacientes en los que se ha realizado una resección quirúrgica alcanzan los 5 años de supervivencia. El pronóstico tras cirugía mejora con quimioterapia y/o radioterapia pero no aumenta de manera importante la tasa de supervivencia (162). Por ello, un mayor conocimiento de la biología molecular del cáncer de páncreas nos ayudará a prevenir, diagnosticar y tratar esta enfermedad (47).

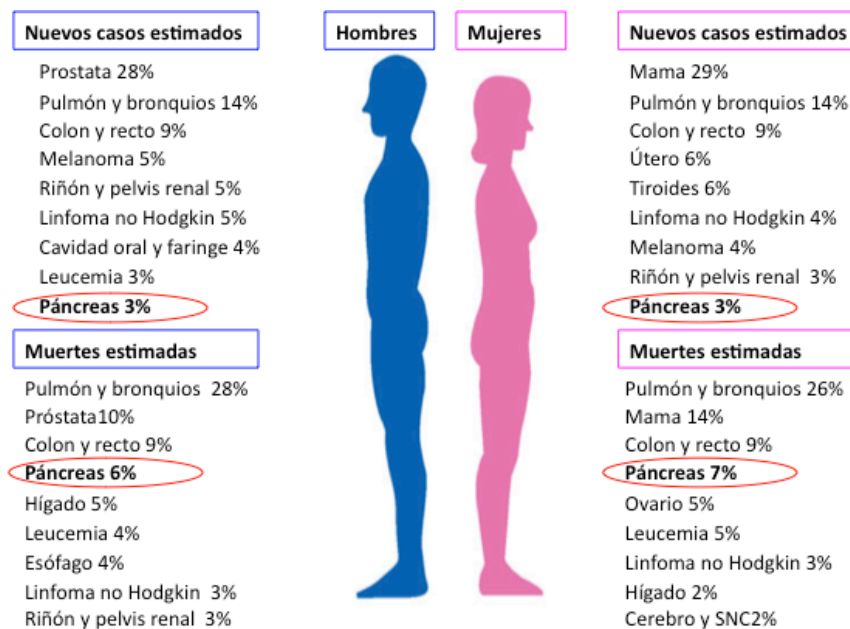


Figura1: Porcentaje de muertes por cáncer estimadas en 2013 en USA, en hombres y mujeres. El cáncer de páncreas (círculo rojo) ocupa la cuarta posición en ambos sexos (Cancer Facts and figures 2013).

3.1 Etiología del adenocarcinoma de páncreas

Se han observado diferentes factores de riesgo que influyen en la etiología del adenocarcinoma de páncreas (157).

-Edad: la incidencia está fuertemente correlacionada con la edad. En EEUU la edad media de diagnóstico de cáncer de páncreas es de 72 años.

-Factores ambientales y estilo de vida: tabaco, alcohol y la inactividad física influyen en el desarrollo de los tumores pancreáticos. En cambio, el uso continuado de aspirina y de otros antiinflamatorios no esteroideos parece reducir la aparición de los tumores de páncreas.

3.- Introducción

-Asociado a otras patologías: diabetes, alergias, infecciones, pancreatitis crónica y aguda en sus diferentes tipos: alcohólica, no alcohólica, hereditaria, tropical, idiopática, etc.

Pancreatitis aguda: la pancreatitis aguda causa una severa insuficiencia en el páncreas. La patogénesis implica la formación de edema y cierto grado de necrosis en el compartimento acinar además de un infiltrado inflamatorio. La integridad del órgano se recupera después de superar el episodio. La pancreatitis aguda y sus recidivas pueden prevenirse con cambios en la dieta (102).

Pancreatitis crónica: la pancreatitis crónica provoca un daño irreversible en el parénquima del páncreas. No se sabe si la pancreatitis crónica tiene su origen en la aguda o si son dos enfermedades distintas (71). Se caracteriza por una severa insuficiencia exocrina y endocrina (117). El consumo de alcohol es su principal causa. Además, existen otros factores como una predisposición genética (pancreatitis hereditarias y autoinmunes), bloqueo o estrechamiento de los ductos pancreáticos (pancreatitis obstructiva), etc. Los pacientes con pancreatitis crónica tienen un riesgo 16 veces mayor que la población control de la misma edad de desarrollar cáncer de páncreas (154).

La incidencia de pancreatitis crónicas en países industrializados está aumentando considerablemente, y la enfermedad afecta a 5 de cada 100.000 habitantes en países occidentales (128). Además, los pacientes con pancreatitis crónica presentan alteraciones moleculares similares a los pacientes con cáncer de páncreas. Así, las mutaciones en el oncogén *K-RAS* (mutación más frecuente en pacientes con cáncer de páncreas) están presentes en un 42% de los pacientes con pancreatitis crónica (83). Por otra parte, los pacientes que sufren cáncer de páncreas desarrollan secundariamente una pancreatitis crónica y diabetes, que se asocia a un peor pronóstico (87).

-Susceptibilidad genética: El desarrollo de cáncer de páncreas en un 5-10% de los casos se deben a mutaciones heredadas en genes específicos (128).

Enfermedad	Gen afectado	Observaciones
El síndrome FAMM. Familiar Atypical Mole-multiple Melanoma	<i>CDK2A</i>	95% de RR
Pancreatitis hereditaria	<i>PRSSI, SPINK1,</i>	40-55% de RA
El síndrome de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>	5-11% de RR (dependiendo de la edad)
Cáncer pancreático familiar	<i>PALLD</i>	El riesgo es mayor según el número de miembros de la familia afectados
La poliposis adenomatosa familiar	<i>APC</i>	El RR de padecer cáncer de páncreas es de un 4.5%

Tabla1: Susceptibilidad genética. Diferentes enfermedades familiares con sus correspondientes mutaciones genéticas y el porcentaje de RR o de RA de padecer cáncer de páncreas. RR: Riesgo Relativo. RA: Riesgo Acumulado.

Mutaciones somáticas: las mutaciones, ya sean espontáneas o debidas a factores ambientales tienen un importante papel en el desarrollo de cáncer de páncreas: mutaciones activantes del oncogén *K-RAS* son los primeros cambios genéticos detectados y están presentes en

3.- Introducción

un porcentaje variable en las metaplasias acino-ductales (ADM), en las lesiones PanIN y en los PDAC (38). Al igual que sucede en otros genes como *CDKN2A*, *P53* y *SMAD4* (58).

3.2 Anatomía del páncreas

El páncreas es un órgano alargado con forma cónica localizado transversalmente en la parte dorsal del abdomen, detrás del estómago. El lado derecho del órgano (cabeza) es la parte más ancha y se encuentra en la curvatura del duodeno. La parte cónica izquierda (cuerpo) se extiende ligeramente hacia arriba y su final (cola) termina cerca del bazo.

El páncreas se puede dividir en dos partes según la función que realiza:

-La parte exocrina: constituida por células epiteliales acinares, centroacinares y ductales (Figura 2). Las células acinares producen las enzimas digestivas y el jugo pancreático, y los secreta al intestino delgado a través de un sistema de conductos exocrinos (células ductales) en respuesta a las hormonas del intestino: secretina y colecistoquinina. Las células centroacinares se sitúan en la unión de las células acinares con las ductales adyacentes.

-La parte endocrina: formada por los islotes de Langerhans, que consisten en cúmulos de células secretoras de hormonas (Figura 2). Estos tipos de células son: *alfa* (sintetizan glucagón), *beta* (producen insulina), *delta* (producen somatostatina), *epsilon* (hacen que el estómago produzca y libere las hormonas) y *gamma* o *PP* (producen el polipéptido pancreático).

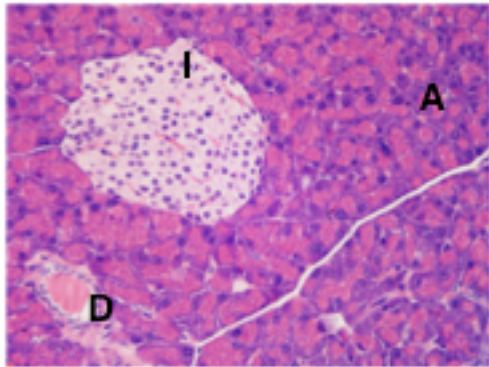


Figura 2: Estructuras anatómicas del páncreas: imagen histológica de un páncreas normal donde se pueden ver los diferentes tipos celulares: acinos (A), ductos (D) e islotes (I).

3.3 Origen celular y desarrollo del adenocarcinoma pancreático ductal

Las células de las lesiones preneoplásicas (PanIN) y de los PDAC presentan características de origen ductal, como la expresión de antígenos ductales (Citoqueratina 19) y crecimiento en estructura tubular (8), por lo que se ha descrito su posible origen a partir de células normales ductales o de sus precursores (56) (60). Sin embargo, los intentos de inducir lesiones PanIN regulando la expresión del oncogén *K-Ras* a través del promotor de la Citoqueratina 19 (promotor

3.- Introducción

de células ductales) no dieron lugar a lesiones PanIN, ni PDAC (12). Este estudio y los resultados posteriores con otros modelos de ratón genéticamente modificados (GEMM) han sugerido un origen acinar de las lesiones PanIN y PDAC. Nuestro laboratorio en 2007, demostró que la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} bajo el promotor de la elastasa desde estadios embrionarios (E.16.5) reproducía el desarrollo de lesiones PanIN y de PDAC invasivos (41). La incidencia y la latencia tumoral observada en este modelo de ratón fue similar a la de otros modelos que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12D} en todas las estirpes celulares pancreáticas desde etapas muy tempranas (50). Estos resultados sugieren que los PanIN se originan por transdiferenciación de células acinares o por una dediferenciación de sus precursores (41) (27). Además, la presencia de las metaplasias acino-ductal (ADM) en estos modelos respaldan la teoría del origen acinar de las lesiones PanIN, fenómeno descrito también en células humanas *in vitro* (55).

Sin embargo, no se puede descartar totalmente la posibilidad de que otros tipos celulares sean el origen celular de las lesiones PanIN, ya que los promotores utilizados para activar el oncogén *K-Ras* podrían expresarse en otras estirpes celulares como células centroacinares o los precursores acinares (41). Las células centroacinares (CAC) situadas en la unión de las células acinares con el ducto comparten características con los ductos, como la expresión de citoqueratina 19 y son el único tipo celular en el páncreas adulto exocrino que retienen expresión de Notch activo (expresión nuclear de Hes 1) (99). La señalización de Notch en el desarrollo del páncreas reprime la diferenciación. Por tanto, la continua activación de esta vía de señalización en las CAC sugiere la persistencia de un programa transcripcional precursor en estas células (99). Además, los ratones en los que se delecciona *Pten* en las células centroacinares del páncreas desarrollan metaplasias y alguno de ellos PDAC (148). Sin embargo, ni en las lesiones PanIN ni en los PDAC humanos se han descrito mutaciones en esta ruta, aunque un estudio señala que un grupo de lesiones IPMN presentan mutaciones en el gen *PI3K* (136). Teniendo en cuenta todo lo explicado anteriormente se puede decir que la activación del oncogén *K-RAS* da lugar a lesiones PanIN que proceden de células acinares, mientras que las células ductales podrían dar lugar a una lesión alternativa (IPMN) mediante la activación de la ruta de señalización de PI3K. La generación de otros modelos genéticos que expresen la Cre recombinasa bajo promotores específicos de células acinares y/o centroacinares deberían clarificar el papel que juegan estas células en la iniciación de las lesiones PanIN y PDAC.

El desarrollo de cáncer de páncreas al igual que el de cáncer de colon tiene lugar a través de diferentes estadios de progresión no invasivos. Las células acinares experimentan un proceso de metaplasia acino-ductal (ADM) caracterizado por la formación de estructuras tubulares (90). Estas metaplasias expresan a la vez, marcadores de tipo ductal y acinar, lo que sugiere que es una etapa de transición y que algunas células no han perdido sus marcadores acinares (41). Experimentos con

3.- Introducción

ratones han confirmado que ADM es un verdadero proceso de transdiferenciación, en los que las células tubulares, similares a los ductos derivan de las células acinares (97).

Se han descrito varios tipos de lesiones precursoras de PDAC: Neoplasia Pancreática Intraepitelial (PanIN), Neoplasia Pancreática Intraductal Mucionosa (IPMN) y Neoplasia Cística Mucionosa (MCN). Las lesiones precursoras más comunes son las lesiones PanIN (90).

Las lesiones PanIN están formadas por células de naturaleza ductal que presentan acumulación de mucina. Se clasifican dependiendo del grado de displasia reflejado por la atipia nuclear y cambios en la arquitectura. Así, de menor a mayor grado de alteración se describen las lesiones: PanIN1A, PanIN1B, PanIN2 y PanIN3 (Figura 3) (148). Las lesiones PanIN están frecuentemente asociadas con atrofia lobulocéntrica y metaplasia acino-ductal (ADM), estructura precursora de las lesiones PanIN (14).

PanIN1: es la lesión inicial. Presenta menor número de alteraciones, ya que no tiene atipia nuclear y la polaridad celular se mantiene con la localización basal del núcleo. Son células columnares de carácter ductal con acúmulo de mucina (PanIN-1A). Las lesiones PanIN-1B presentan una estructura micropapilar.

PanIN2: caracterizadas por atipia nuclear, presencia de mitosis y pérdida de polaridad celular.

PanIN3: o carcinoma *in-situ*, presenta todas las características de malignidad: alto grado de atipia nuclear, pérdida de polaridad celular, mitosis frecuentes y proliferación celular. Sin embargo, estas lesiones mantienen intactas su membrana basal y no presentan signos de invasividad.

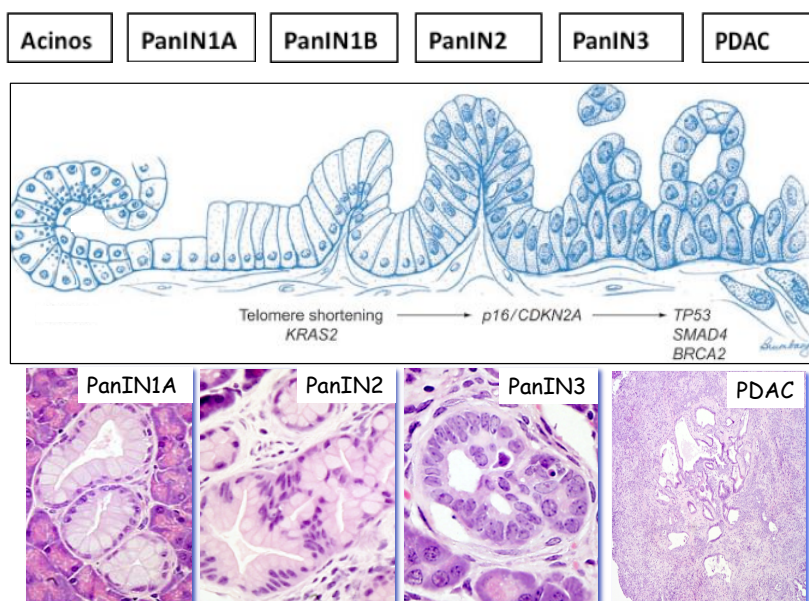


Figura 3: Esquema ilustrativo de la progresión del adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC). **Panel superior:** esquema de la arquitectura de las lesiones PanIN y de la acumulación de mutaciones desde los primeros estadios de lesión PanIN hasta PDAC (90). **Panel inferior:** imágenes de Hematoxilina-eosina de los diferentes grados de lesiones PanIN y PDAC del modelo de ratón *Elask-Ras^{G12V}* (41).

3.- Introducción

Los diferentes estadios de la progresión tumoral se caracterizan también por la acumulación de alteraciones moleculares (56). La mutación mejor caracterizada durante los estadios tempranos del desarrollo de PDAC es la activación del oncogén *K-RAS*, que principalmente ocurre por la conversión de glicina a ácido aspártico o valina en el codón 12. Así, el 74% de las lesiones PanIN de bajo grado y el 63% de los focos ADM asociados a estas lesiones encontradas en humano, presentan mutaciones en el oncogén *K-RAS* (140). Este porcentaje incrementa con la progresión, siendo del 90% en los PDAC. El acortamiento de los telómeros es otro fenómeno de aparición temprana en el desarrollo de las lesiones, que además contribuye a la acumulación de alteraciones cromosómicas (53). La inactivación del gen *INK4a* ocurre en lesiones de estadio intermedio (PanIN2), y la inactivación de otros genes supresores de tumores (*SMAD4*, *TP53*, y *BRACA2*) se detecta en las lesiones de alto grado (PanIN3) (58). Se han descrito otras alteraciones en estadios avanzados de PanIN y PDAC como sobreexpresión de factores de crecimiento, al igual que activación de rutas de señalización como NFκβ, STAT3 y SRC (61).

IPMN, Neoplasia Pancreática Intraductal Mucionosa derivan del ducto pancreático principal o de algunas de sus ramas presentando una arquitectura papilar (59). Estas lesiones expresan el marcador MUC2, mientras que los PanIN expresan MUC1 (90). Un estudio reciente ha identificado 27 mutaciones en estas lesiones y 16 en MCN (165). En un 95% de las lesiones de IPMN se describen mutaciones que afectan al oncogén *K-RAS*, otras mutaciones descritas incluyen a los genes *GNAS* y *RNF4*. La mayoría de los adenocarcinomas invasivos que se relacionan con las lesiones IPMN presentan mutaciones en *GNAS* indicando que las lesiones IPMN pueden ser precursoras de PDAC (166). El gen *SMAD4* se encuentra inactivado en una minoría de estas lesiones, mientras que la pérdida de *STK11/LKBI* es mucho más común (20). Dentro de este grupo se engloban lesiones que presentan características histológicas diferentes, las IOPN (Intraductal Oncocytic Papillary Neoplasm), que están compuestas por numerosas células epiteliales neoplásicas y presentan abundantes eosinófilos en su citoplasma (57).

El tercer tipo histológico de lesión precursora es **MCN**, Neoplasia Cística Mucinoso. La gran mayoría de estas lesiones se describe en mujeres. Presentan un estroma parecido al de ovario y expresan receptores estrogénicos. A nivel molecular presentan mutaciones en el oncogén *K-RAS*, *RNF43* y las mutaciones en *P53* y *SMAD4* aparecen en estadios más avanzados (90).

3.4 Genética molecular del cáncer de páncreas

3.4.1 Oncogenes

La mutación activante del oncogén *K-RAS* localizado en el cromosoma 12 (12p12.1) es la alteración genética que se observa en un 90-95% de los casos de PDAC (18) (2). Además, es una de las más tempranas en aparecer, ya que se observa en un 36%, 44% y 87% de las lesiones PanIN1A, PanIN1B y PanIN2/3 respectivamente (Figura 3) (90). Las mutaciones puntuales que dan lugar a la activación del oncogén *K-RAS* están presentes en el codón 12, aunque se observan también en menor frecuencia en los codones 13 y 61 (18).

K-RAS es un miembro de la familia guanosina trifosfato de unión a proteínas, con actividad reguladora GTP-hidrolasa, que alterna dos conformaciones estructurales: una forma activa, en la que la proteína RAS está unida a guanosín trifosfato (GTP), llamada RAS-GTP y otra forma inactiva, en la que la proteína RAS está unida a guanosín difosfato (GDP), llamada RAS-GDP. Esta familia controla diferentes funciones, como la integridad del citoesqueleto, proliferación, diferenciación, adhesión, migración celular y apoptosis. Las mutaciones de *K-Ras* afectan a la actividad GTPasa del gen dando lugar a una proteína constitutivamente activa (51).

La alta frecuencia de la mutación de *K-RAS* en lesiones PanIN humanas confirma el papel principal de *K-RAS* en el inicio y desarrollo de la enfermedad (140). Dicho papel del oncogén ha sido reiterado en los diferentes modelos animales que se han generado para el estudio del cáncer de páncreas (41) y (50).

La activación de K-RAS controla numerosas rutas efectoras, entre las que caben destacar: la ruta MAPK (Proteínas Quinasas Activadoras de Mitógenos), PI3K (Familia de la Fosfatidilinositol 3 Quinasa) y RalGDS (172).

Varias líneas de investigación señalan a la ruta de las MAPK quinasas como una vía esencial en el desarrollo de cáncer de páncreas (115). Una tercera parte de los casos de PDAC que presentan mutado el oncogén *B-RAF* no presentan mutaciones en el oncogén *K-RAS* (19). La mutación V600E representa el 90% de las mutaciones de B-RAF en PDAC, lo que da lugar a la activación de la ruta MAPK en ausencia de la mutación de *K-RAS*.

Sin embargo, *RAS* también contribuye a la activación de la ruta PI3K, independientemente de fenómenos genéticos que también puedan activar dicha vía, como la amplificación del gen *AKT2* en el cromosoma 19, que sucede en el 10-15% de los casos de cáncer de páncreas o las mutaciones del gen *PIK3CA* que se observa en las lesiones IPMN (136). La vía de señalización de

3.- Introducción

PI3K/AKT se encuentra activada de manera uniforme en PDAC humanos y en modelos murinos de cáncer pancreático inducidos por la expresión de K-Ras (170). De hecho, un reciente estudio explica que la activación de la vía PI3K, es esencial para el desarrollo de tumores pancreáticos inducidos por la expresión del oncogén *K-Ras* (30).

3.4.2 Genes supresores de tumores (*p16/CDKN2A*, *P53* y *DPC4/SMAD4*)

El gen *p16/CDKN2A*, situado en el cromosoma 9p, también conocido como *INK4A*, codifica para una proteína que pertenece a la familia de inhibidores de Ciclinas Dependientes de Quinasas (CDK), impidiendo la progresión normal del ciclo celular. Es el supresor tumoral que aparece con mayor frecuencia mutado en los PDAC (17). La pérdida de la expresión de p16 se ha detectado en el 30%, 55%, 70% y 90% de las lesiones PanIN1, PanIN2, PanIN3 y PDAC respectivamente (Figura 3). La inactivación tiene lugar mediante diferentes mecanismos: delección homocigota (40%), mutación con pérdida del segundo alelo (40%) y silenciamiento por metilación del promotor (20%) (91).

La inactivación de *P53*, situado en el cromosoma 17p, se ha visto en un 50-70% de los casos de PDAC (104). En la mayoría de los casos es debido a la pérdida del segundo alelo, mientras que el primero aparece mutado (129). La mayoría de las mutaciones de *P53* ocurren en los últimos estadios de PanIN, reflejando así la función de *P53* en la prevención del proceso tumoral (58). La pérdida de *P53* acelera el proceso de inestabilidad genómica característica de estos tipos de tumores (9). En contraste con otros tipos de tumores parece que en los tumores pancreáticos no hay una relación recíproca entre la pérdida de *CDKN2A* y *P53*.

El gen *DPC4* o *SMAD4*, situado en el cromosoma 18q21, se encuentra inactivado en el 55% de los casos de carcinoma de páncreas: el 30% debido a una delección homocigota y el 25% de los casos por una mutación intragénica y pérdida del segundo alelo (43).

Otros supresores tumorales se encuentran inactivados, aunque en menor proporción (5-10%):

LKB1/STK11 (Liver Kinase B1) situado en el cromosoma 19p, un miembro de la familia serina-treonina quinasa. Mutaciones en línea germinal de este gen están asociadas con el síndrome de Peutz-Jeghers, caracterizado por el desarrollo de pólipos gastrointestinales (90).

MKK4 (MAP2K4/SEK1) situado en el cromosoma 17p, es un miembro de la familia de MAPK. Se propone a MKK4 como supresor de la metástasis ya que la pérdida de su expresión, está asociada con la iniciación de la metástasis en cáncer de páncreas (167).

3.4.3 Acortamiento de los telómeros

Los telómeros son una secuencia hexamérica de repeticiones TTAGGG al final de los brazos de los cromosomas que le confieren estabilidad genómica durante la división celular (98). Se ha demostrado mediante la técnica de hibridación *in-situ* que un 90% de las lesiones PanIN de bajo grado presentan un marcado acortamiento de los telómeros, comparado con tejido ductal normal (155). Como consecuencia, se crea un ambiente permisivo a la adquisición de reordenamientos cromosómicos en las lesiones PanIN. En la mayoría de los casos, las células que presentan inestabilidad cromosómica son eliminadas mediante la activación de *P53*. Estas alteraciones cromosómicas persisten en células con mutaciones en *P53* (como ocurre en las lesiones de alto grado), provocando la rápida acumulación de alteraciones genómicas (98). Paradójicamente, en la mayoría de los PDAC invasivos se observa la reactivación de la telomerasa. Se cree que se produce para atenuar la continua inestabilidad genómica y estabilizar las células tumorales contra la posible catástrofe que pueden causar los reordenamientos cromosómicos (135).

3.4.4 Rutas de señalización implicadas en el desarrollo, Hedgehog y Notch

La señalización paracrina de **Hedgehog (Hh)** no sólo juega un papel importante en el desarrollo del sistema gastrointestinal, sino también en el mantenimiento de la homeostasis del tejido adulto (149). En la mayoría de los tumores epiteliales la activación aberrante de Hh es consecuencia de una sobreexpresión de los ligandos Hh, más que de una mutación en una de las cascadas de señalización (160). Varias evidencias demuestran la implicación de la ruta de Hh como uno de los primeros eventos en el cáncer de páncreas. Los ligandos de la ruta Hedgehog se encuentran sobreexpresados en las lesiones preneoplásicas PanIN e IPMN, al igual que en pancreatitis crónica (150). Además, el análisis del patrón de expresión de células tumorales humanas, y de las lesiones PanIN muestran un aumento en los niveles de expresión de Gli (factor de transcripción de la ruta Hh) (123). La señalización prolongada de Hedgehog es crítica en el mantenimiento del PDAC. El bloqueo de la ruta de Hh *in vivo* con el inhibidor ciclopamina resulta en una moderada inhibición del crecimiento tumoral pancreático en un modelo de xenograft (150). El uso del inhibidor IPI-926 (derivado semisintético de la ciclopamina) junto con Gemcitabina (quimioterápico citotóxico) disminuye de manera importante el tamaño de los tumores de páncreas y aumenta la media de supervivencia en el modelo tumoral KPC. El inhibidor actúa sobre la señalización paracrina de la ruta Hh disminuyendo la cantidad de estroma y aumentando la vascularización intratumoral (112).

La familia de proteínas **Notch** está compuesta por 4 receptores transmembrana. Durante el desarrollo del páncreas los componentes de esta ruta son necesarios para dirigir el destino celular y la renovación de las células progenitoras (3). Así, Hes 1 (factor de transcripción de la

ruta de Notch) puede reprimir Neurog 3 (importante factor de transcripción proendocrino). Por tanto, en ausencia de *Hes1* se produce una aceleración en la diferenciación endocrina en el páncreas (80). La señalización a través de Notch, también está implicada en la transdiferenciación acino-ductal (99). La expresión de los ligandos, receptores y los transcritos de Notch está elevada en las lesiones PanIN al igual que en los tumores invasivos (99). El papel de Notch ha sido estudiado en GEMMs. Así se ha observado una fuerte sinergia entre la presencia de los receptores activados de Notch y la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D} en el desarrollo de lesiones PanIN (27). La eliminación condicional de los receptores de Notch en tumores pancreáticos inducidos por el oncogén *K-Ras*^{G12D} ilustra que la deficiencia de Notch2, pero no de Notch1, reduce la progresión de lesiones PanIN y prolonga la supervivencia (95). Sin embargo, en otro estudio la pérdida de Notch1 coopera con la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D} dando lugar a un incremento de la incidencia y progresión tumoral, lo que hace pensar que Notch1 puede actuar como supresor tumoral en el desarrollo de PDAC (45). Además, se han testado diferentes inhibidores de Notch en modelos de cáncer de páncreas. MRK-003, un inhibidor de la gamma secretasa, limitó el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D} (121). Recientemente, este mismo inhibidor se ha usado para tratar tumores de estadios más avanzados en un modelo muy similar. Mientras que, el tratamiento con MRK-003 no tuvo ningún efecto, la combinación con Gemcitabina incrementó la supervivencia (25).

3.4.5 Matriz extracelular y estroma

Los tumores pancreáticos poseen gran capacidad invasiva y metastásica. La invasión de tejidos adyacentes se produce por la pérdida de la adhesión celular y la invasión de la membrana basal. Esto provoca la rotura de la matriz extracelular (ECM), permitiendo así la interacción entre las enzimas como las metaloproteasas y las proteínas que componen la matriz extracelular (33).

Matriz de metaloproteasas: Es una familia que contiene numerosas enzimas cuya función es romper las proteínas de la matriz extracelular (34); actúan en una de las primeras etapas de la invasión. Se clasifican según su especificidad por el sustrato. Así, MMP-2 y MMP-9 son gelatinasas; MMP-1 y MMP-3 son colagenasas; MMP-7 se conoce como matrilisina (78). La actividad de las metaloproteasas está regulada por citoquinas, factores de crecimiento y oncogenes. Muchos estudios han correlacionado el aumento de la expresión de MMP con un peor pronóstico, menor tiempo de supervivencia y la presencia de invasión local o de metástasis (106). Concretamente se ha descrito que la expresión de MMP7 tiene un impacto negativo en la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas (33).

3.4.6 Factores de crecimiento

Son un grupo de moléculas que transmiten señales entre las células regulando procesos importantes como la división celular, diferenciación y migración.

Factor de crecimiento de fibroblastos: esta familia está compuesta por 20 miembros con diferentes funciones biológicas, entre las que destaca la regeneración de tejidos, reparación y migración celular. Dos de los miembros más estudiados son el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF1 o aFGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF2 o bFGF). El aumento de expresión de bFGF se correlaciona con metástasis y con menor supervivencia (5).

Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular: Esta familia consiste en 6 citoquinas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y PlGF (Factor de Crecimiento de Placenta) (151). Su función es la de incrementar la permeabilidad del endotelio vascular. La presencia de VEGF y del receptor es un importante marcador para la detección de PDAC (79).

Factores de crecimiento epidérmico: La familia ErbB/HER de receptores de tirosina quinasa (RTK) comprende 4 receptores: EGFR (ErbB-1/HER1), ErbB2 (neu, HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4) (Figura 4). Los miembros de esta familia presentan un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembrana hidrofóbica y la región citoplasmática que contiene el dominio tirosina quinasa. Este último dominio está altamente conservado en todos los miembros. Por el contrario, la región extracelular está menos conservada, lo que sugiere diferente especificidad para cada ligando (Figura 4) (131).

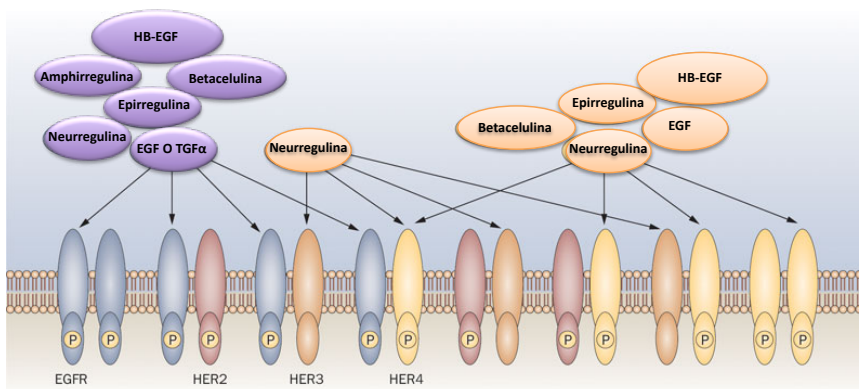


Figura 4: Dímeros y ligandos de los receptores de la familia ErbB. Unión de los ligandos a los dímeros de la familia de receptores ErbB (EGFR: azul, HER2: granate, Her3: naranja y HER4: amarillo) dando lugar a su activación a través del dominio tirosina quinasa (P).

Estos receptores ErbB se activan por unión al ligando (Figura 4). Los ligandos son factores de crecimiento de la familia EGF, que son producidos por las mismas células que expresan los receptores ErbB (secreción autocrina) o por las células de alrededor (activación paracrina). Los ligandos pertenecientes a la familia EGF se pueden clasificar dependiendo del receptor al que se unan. Así, el primer grupo incluye Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de

3.- Introducción

Crecimiento Transformante (TGF α) y Amphirregulina (AR), los cuales se unen específicamente a EGFR. El segundo grupo incluye Betacelulina (BTC), Factor de Crecimiento de Unión a la Heparina (HB-TGF) y Epirregulina (EPR), los cuales presentan especificidad por EGFR y HER4. El tercer grupo está compuesto por Neurregulinas (NRG), que a su vez se dividen según la capacidad de unión a HER3 y HER4 (NRG-1 y NRG-2) o sólo a HER4 (NRG-3 y NRG-4). Ninguno de los ligandos de la familia de factores de crecimiento se unen a HER2 (168) (Figura 4).

La unión del ligando al dominio extracelular de los receptores induce la formación de homodímeros y heterodímeros y como consecuencia la activación de la región tirosina quinasa. La fosforilación de dichos residuos sirve para activar diferentes moléculas implicadas en la regulación de cascadas de señalización intracelular.

Los receptores ErbB se expresan en una variedad de tejidos epiteliales y mesenquimales en los que juegan un papel muy importante en el desarrollo, proliferación y diferenciación. Por otra parte, numerosos grupos han descrito la sobreexpresión de dichos receptores en numerosos tumores sólidos. En los tumores de páncreas se ha encontrado principalmente sobreexpresado EGFR (111).

3.5 EGFR

Es una proteína de membrana de 170 KDa. En ausencia de ligando existe como monómero en la superficie de la célula. La unión del ligando permite la formación de homo y heterodímeros, que da lugar a la autofosforilación de los residuos tirosina quinasa. Dicha fosforilación sirve como sitio de unión de diferentes moléculas, que activan cascadas de señalización intracelulares: RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K-AKT, JAK-STAT y PLC γ -PKC, implicadas en la proliferación y supervivencia celular (Figura 5).

3.5.1 Principales vías de señalización de EGFR

RAS/MAPK: La vía de RAS/RAF/MAPK es una de las rutas más estudiadas y mejor descritas en cáncer (101) (Figura 5). El papel de esta ruta es crítico para muchos procesos relacionados con el cáncer como crecimiento y división celular, diferenciación y migración, angiogénesis, etc. RAS es el regulador central de la señalización desde la parte extracelular hasta la región citoplasmática. En condiciones normales RAS está unida a GDP y es inactiva. La unión del ligando con EGFR activa al receptor que transmite su señal a través de su dominio de activación tirosina quinasa, y promueve la liberación de SOS, que rompe la unión RAS-GDP y da lugar a la forma activa, RAS-GTP. La formación de este complejo desencadena la actividad quinasa a través de RAF hasta llegar a MAPK. Las mutaciones activantes en miembros de la

3.- Introducción

familia RAS/RAF/MAPK dan lugar a un aumento de la tumorigenicidad. Además de RAF y MAPK hay otros efectores de RAS, como PI3K dango lugar a conexiones entre rutas (172).

JAK/STAT: Esta vía tiene un papel muy importante en la regulación de la transcripción. En mamíferos se han identificado 7 genes STAT (STAT 1-4, 5a, 5b, STAT 6). Estas proteínas son factores de transcripción inactivos y sólo son activados y transportados al núcleo por la activación de un receptor específico. El modelo de activación clásico consiste en la transmisión de la señal por el residuo tirosina quinasa del receptor. Esta señal promueve la activación y dimerización de JAK, que promueve el reclutamiento de STAT por el dominio intracelular de los receptores de citoquinas a través de uniones específicas de las regiones SH2 de STAT y los residuos de tirosina de los receptores de citoquinas. STAT1, 3 y 5 están implicadas en la señalización de EGFR, pero la forma de activación difiere de la llevada a cabo por los receptores de citoquinas (69) (Figura 5).

PLD, PLC γ y PI3K: De todas las enzimas implicadas en los rutas de metabolismo al menos tres pueden ser activadas directamente por EGFR (Figura 5). La fosfolipasa C, (PLC γ), la fosfolipasa D (PLD), y la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Figura 5). En cambio otras como la fosfolipasa A2 están reguladas a través de EGF mediante la activación de diferentes rutas de señalización (69).

PLD hidroliza a la fosfatidilcolina para generar colina y su segundo mensajero, el ácido araquidónico (AA). El mecanismo de activación aún no está claro, ya que parece que necesita la unión a EGFR pero no la fosforilación de sus residuos tirosina. Ocurre lo mismo con PLC γ , sugiriendo un mecanismo común de activación (144).

PLC γ se une directamente a los sitios de autofosforilación de EGFR. Cuando se activa PLC γ hidroliza a una serie de enzimas para producir los segundos mensajeros 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,3,5- trifosfato (IP₃) (159).

La ruta de señalización PTEN/PI3K/AKT está basada en la localización de AKT en la membrana celular; su posición da lugar a diferencias en la regulación (21). PI3K puede fosforilar ciertos lípidos de unión a la membrana como los fosfatidilinositoles. Esta fosforilación tiene varios pasos que van desde: fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP), fosfatidilinositol (3,4) bifosfato (PIP₂) y fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP₃). Las formas fosforiladas de PIP₃ y en menor medida PIP₂ atraen importantes quinasas a la membrana celular. La más importante es AKT, que pertenece a una familia de quinasas de serina/treonina implicadas en importantes procesos celulares (metabolismo de glucosa, proliferación y migración celular). En los tumores pancreáticos AKT actúa como un oncogén ya que se hace independiente de la parada del ciclo celular (133), bloquea

3.- Introducción

la apoptosis y promueve la angiogénesis (86). PTEN es una fosfatasa que actúa en oposición a PI3K. PTEN actúa de supresor tumoral por la conversión de PIP_3 a PIP_2 y a PIP reduciendo la actividad de AKT por su deslocalización en la membrana (89). Los niveles de PI3K y AKT son altos en la mayoría de los tumores, mientras que PTEN está inactivo, bien por mutación o por delección. La ruta PI3K/AKT/PTEN se considera una de las más importantes dianas terapéuticas en cáncer (133).

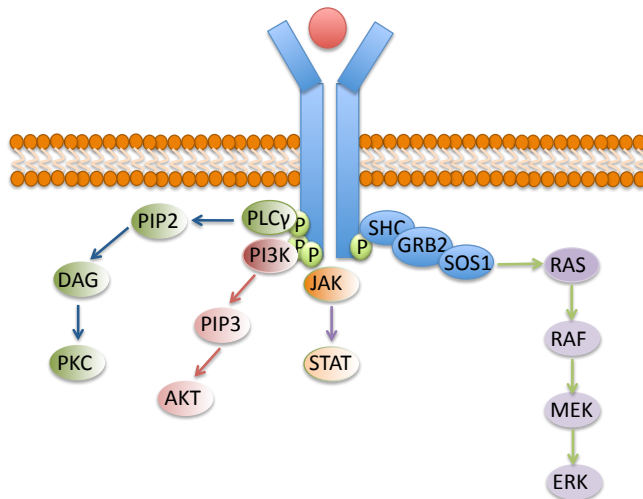


Figura 5: Principales rutas de señalización de EGFR. Después de la unión del ligando a EGFR se produce su activación. El grupo tirosina quinasa situado en la región citosólica del EGFR transmite la señal a través de sus tres principales rutas efectoras: PLC γ y PI3K/AKT, JAK/STAT y RAS/RAF/MAPK.

3.5.2 EGFR en cáncer

Como se ha explicado anteriormente, EGFR está implicado en procesos de proliferación, supervivencia y motilidad celular, pero también se ha visto anormalmente activado en numerosos tipos de cáncer: ovario, pulmón, mama y páncreas (111). Dependiendo del tipo de tumor el mecanismo que provoca la activación anómala de EGFR es distinta: sobreexpresión del receptor, incremento en la producción de los ligandos, mutaciones de EGFR que dan lugar a la permanente activación del mismo, defectos en las rutas de señalización de EGFR, etc (Figura 6).

Incremento en la producción de ligando: TGF α y EGF se encuentran frecuentemente co-expresados con EGFR en numerosos tipos de cáncer y se considera que ambos ligandos actúan de forma autocrina/paracrina en la regulación de EGFR, provocando crecimiento tumoral de manera incontrolada. Así, la sobreexpresión de TGF α en ratones transgénicos induce la formación de tumores (74). Además, la expresión de TGF α junto con EGFR en varios tumores da lugar a una mayor proliferación celular y peor pronóstico en los pacientes comparado con los que sólo tienen expresión de EGFR. Anticuerpos monoclonales contra EGFR han demostrado tener un efecto antiproliferativo en las células tumorales que expresan EGFR. Estos anticuerpos se unen a EGFR impidiendo la unión de éste con el ligando (171).

3.- Introducción

Incremento en los niveles de expresión de EGFR: niveles elevados de EGFR se correlacionan con una reducción en la tasa de supervivencia en varios tipos de cáncer como el de páncreas (153), ovario, cabeza y cuello, vejiga y esófago (111). Existen diferentes mecanismos por los que EGFR se incrementa en las células tumorales:

-Amplificación: se ha visto en numerosos tipos de cáncer: páncreas, carcinoma de mama, cáncer de pulmón (NSCLC) y particularmente glioblastoma multiforme (163).

-Incremento de la actividad del promotor o la desregulación a nivel translacional y post-translacional: se sabe que la proteína p53 en su forma salvaje y mutada activa la transcripción de EGFR porque se une a los sitios específicos del promotor. Como los niveles de p53 son altos en las células tumorales permite una fuerte y constante activación del promotor del EGFR y por tanto de su expresión, como sucede en los tumores de mama (16).

-Recirculación post-translacional del receptor: Como sucede en los papilomas esofágicos producidos por la infección por Virus del Papiloma Humano (HPV). De forma contraria a lo que sucede en otros tejidos, en las células del papiloma una parte de EGFR es recircularizado a la membrana celular después de la estimulación con EGF (171).

Mutaciones de EGFR:

-Mutaciones en el dominio extracelular: son frecuentes en glioblastoma multiforme. La mayoría son deleciones de exones que codifican parte o la totalidad del dominio extracelular. Dan lugar a la formación de receptores truncados, los cuales son activados constitutivamente y escapan a las vías normales de regulación (171).

-Mutaciones intracelulares: consisten en deleciones y/o duplicaciones de exones que codifican para la región tirosina quinasa. Están descritas principalmente en glioblastoma multiforme y en tumores de pulmón (85). De los 7 exones (18-24) que forman esa región, las mutaciones quedan restringidas sólo a los exones 18-21. De acuerdo con la base de datos Cosmic (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>) las mutaciones más frecuentes son: pequeñas deleciones en el exon 19, pérdida del sentido de lectura (mutación L858R en el exon 21 y G719A/C en el exón 18) y pequeñas duplicaciones en determinadas regiones del exón 20. Estas mutaciones prolongan la unión del ligando activando al receptor (147).

3.- Introducción

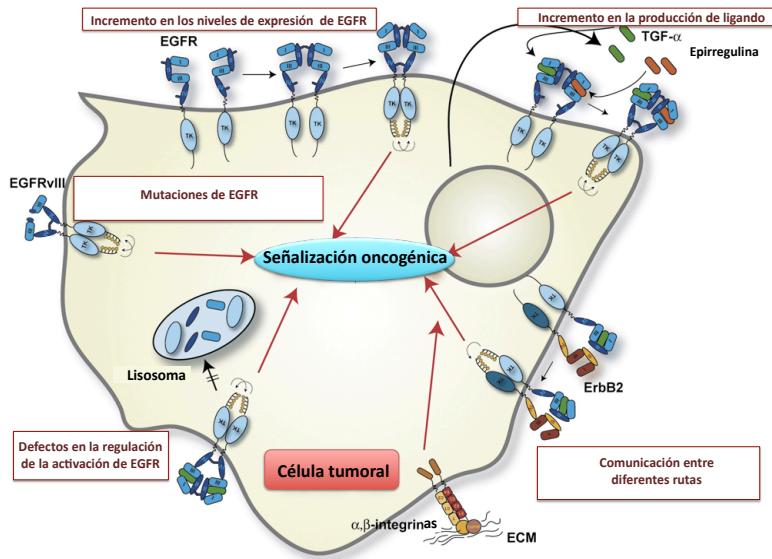


Figura 6: Esquema de los mecanismos que dan lugar a una señalización oncogénica de EGFR. Existen varios mecanismos por los que se pierde la estrecha regulación de la unión del ligando a EGFR: incremento en sus niveles de expresión, incremento en la producción de ligando, mutaciones de EGFR, defectos en la regulación de la activación de EGFR, comunicación entre rutas de señalización de EGFR y otros miembros que contengan grupos tirosina quinasa.

Defectos en la regulación de la activación de EGFR: una señalización anómala de EGFR está relacionada con la transformación neoplásica de las células. La señalización de EGFR promueve la internalización y posterior degradación del receptor (143). Cuando el receptor sufre mutaciones en el dominio citosólico pierde parte de los mecanismos que intervienen en la regulación de su señalización (161). Otra forma de regulación negativa de EGFR es por sobreexpresión de ErbB2, que permite la activación constitutiva de EGFR independientemente de la unión al ligando (164). ErbB2 está sobreexpresado en algunos tipos de tumores, pudiendo desplazar la formación de homodímeros de EGFR a través de la formación de heterodímeros EGFR/ErbB2 (169). Defectos en la señalización de los heterodímeros (EGFR/ErbB2) dan lugar a una señalización más potente que la que se genera a través de los homodímeros (169). Por tanto, la sobreexpresión de ErbB2 es uno de los mecanismos de activación más potentes de EGFR (46).

La unión del ligando con el receptor también tiene una fuerte influencia en la degradación del receptor. EGFR es degradado eficientemente después de la unión a EGF, pero no cuando se une TGFα (116). Se debe a que TGFα es más sensible a pH bajos de los endosomas que EGF. Así, cuando TGFα se une a EGFR, el ligando se disocia del receptor y el receptor se recirculariza a la superficie de la membrana. Sin embargo, cuando EGF se une al receptor, la mayor parte del ligando permanece unido al receptor y se degrada junto a EGFR (116). Esto puede explicar por qué TGFα es más potente como mitógeno que EGF cuando se co-expresa con EGFR (138).

Comunicación entre diferentes rutas: EGFR interactúa con otros miembros de la familia ErbB, así como con otros receptores de tirosina quinasa, receptores de citoquinas, etc (114).

3.- Introducción

Se ha descrito la comunicación entre diferentes rutas de EGFR y otras moléculas de adhesión de la matriz extracelular de proteínas (ECM) que inducen la fosforilación de EGFR independiente de la unión al ligando. Esta activación señala a través de PI3K y de MAPK (42).

La transactivación de EGFR a través de los ligandos del receptor acoplado a proteínas G (GPCR) juega un papel importante en tumorigénesis, mediante dos mecanismos: 1) Independiente de la unión de EGFR al ligando, debido al reclutamiento de EGFR en un complejo a través de GPCR que da lugar a la fosforilación de los residuos de tirosina quinasa del receptor (124) y 2) Dependiente del ligando, por la unión de metaloproteasas (MMP) al complejo GPCR que rompe la unión de los ligandos (HB-RGF, TGF α) a la membrana, y así quedan libres para poderse unir a EGFR (31).

3.5.3 Inhibidores de EGFR

EGFR se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de neoplasias, incluyendo cáncer de páncreas (37) (93). Dicha sobreexpresión causa un incremento en la señalización de EGFR que se asocia con el potencial metastásico del tumor y con la disminución en la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas (152). Además, la expresión citoplasmática de EGFR se asocia con mayor grado de malignidad tumoral y con tiempos cortos de supervivencia de pacientes con PDAC (153). Se han desarrollado dos mecanismos de inhibición de EGFR: mediante anticuerpos monoclonales (mAb), que se unen a su dominio extracelular y mediante inhibidores tirosina quinasa (TKI), que impiden la señalización inhibiendo el dominio intracelular (73). Existen también otros agentes de quimioterapia que actúan sobre diferentes miembros de las vías de señalización de EGFR como inhibidores farnesil transferasa, inhibidores angiogénicos, inhibidores de quinasas como el sorafenib, etc .

Anticuerpos monoclonales: los anticuerpos monoclonales contra EGFR como Cetuximab y Panitumumab se han diseñado para unirse directamente a la región extracelular y competir con el ligando (15). Interfieren por tanto, con la dimerización, fosforilación y transducción de señales del receptor (Figura 7). También puede causar endocitosis del receptor (131).

Cetuximab: Erbitux^R, Imclone/Bristol-Meyers Squibb, (NY), bloquea la señalización intracelular de EGFR por impedir la interacción ligando-receptor y facilita la internalización de EGFR (137). El 60% de los pacientes con cáncer colorectal que no presentan mutaciones de *K-RAS* se benefician de este tratamiento (156). En un estudio de fase III con 735 pacientes tratados con Gemcitabina o Gemcitabina+Cetuximab no se observó ninguna diferencia en media de supervivencia, ni en supervivencia libre de enfermedad (PFS) (120).

3.- Introducción

Inhibidores de los residuos de tirosina quinasa (TKI): se unen competitivamente al dominio intracelular tirosina quinasa de EGFR inhibiendo la autofosforilación de EGFR y por lo tanto, impidiendo su señalización (137). Estos inhibidores, como Erlotinib, Gefitinib, Lapatinib y Canertinib presentan importantes ventajas frente a los anticuerpos monoclonales, como la administración por vía oral y rápida distribución por todo el organismo. En cambio, presentan limitaciones en la dosis debido a efectos secundarios que no ocurren con los anticuerpos monoclonales (145) (Figura 7).

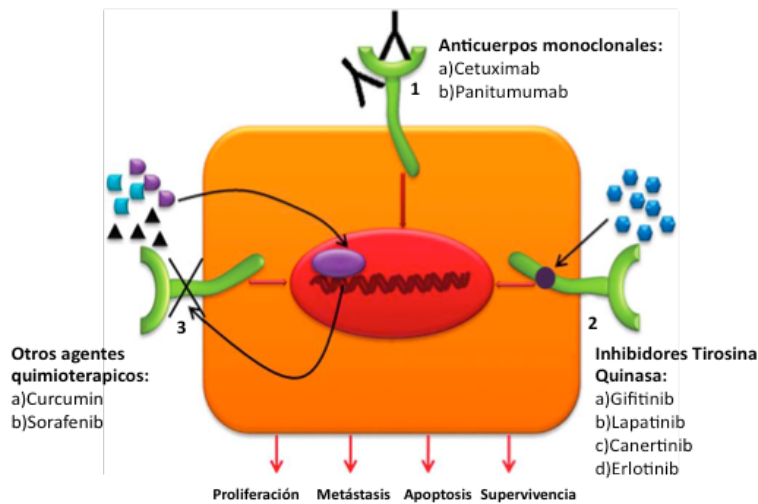


Figura 7: Representación esquemática de las diferentes estrategias de inhibición de EGFR. 1. Mediante anticuerpos monoclonales (cetuximab y panitumumab), 2. Inhibidores del dominio tirosina quinasa (erlotinib, gefitinib, lapatinib y canertinib) y 3. Otros agentes de quimioterapia que actúan en las rutas de señalización de EGFR (genistein, curcumin, caspacin).

Erlotinib: Tarceva, OSI Pharmaceutical, Uniondale, NY inhibe de manera reversible la actividad quinasa de EGFR (66). Se ha demostrado que Erlotinib presenta actividad *in vivo* e *in vitro* en estudios preclínicos en diferentes líneas tumorales incluyendo ovario y NSCLC (122). Se ha evaluado la actividad de erlotinib en ensayos clínicos de fase I de tumores sólidos usando diferentes posologías (49). Erlotinib ha sido el primer inhibidor de EGFR en ser aprobado para su uso debido al aumento de la supervivencia en un 8% de los pacientes tratados con Erlotinib comparados con aquellos que fueron tratados con placebo (139). Además, el uso combinado de Erlotinib y Gemcitabina aumenta el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia en términos generales en pacientes con cáncer de páncreas avanzado (103).

3.6 Modelos murinos para el estudio del papel del oncogén *K-Ras* en el desarrollo tumoral de páncreas, pulmón e intestino

Desde la década pasada se han generado GEMMs que reproducen fielmente la biología de los diferentes tipos de tumores, incluyendo la iniciación y progresión, el papel de la inflamación y el estroma que rodea al tumor (127).

3.- Introducción

El primer GEMM que recapituló la progresión tumoral pancreática del oncogén *K-Ras* se desarrolló en 2003 por el laboratorio del Dr. Tyler Jacks (50). Se trata de un modelo knockin condicional en el que la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D} permanece silenciada hasta que el casete de parada transcripcional flanqueado por sitios LoxP (LSL, LoxP-STOP-LoxP) presente en el alelo mutado es eliminado por la recombinasa Cre.

La ventaja del sistema Cre/LoxP es que permite controlar tanto el tiempo, como el lugar de expresión de la Cre recombinasa y del oncogén *K-Ras* dependiendo del promotor utilizado. Los GEMMs desarrollados inicialmente utilizan el modelo transgénico *Pdx1*-Cre y la línea Knockin *Ptf1a*^{+Cre} que expresan la Cre recombinasa en estadios tempranos del desarrollo embrionario. Por lo que el oncogén *K-Ras* se expresa en todas las estirpes celulares del páncreas y desde estadios muy tempranos del desarrollo embrionario (96).

Las lesiones PanIN humanas progresan a PDAC debido a alteraciones epigenéticas o genéticas, incluyendo inactivaciones o mutaciones de *p16/CDKN2A* (>95%), *TP53* (50-75%). Estudios realizados en modelos de ratones que expresan de manera condicional el oncogén *K-Ras* en el páncreas junto con la pérdida mono o bialélica de *p16/19* (1) y *p53* (6), o la concomitante expresión de dominantes negativos de *p53* (52) desarrollan PDAC invasivos y metastáticos. Estos PDAC presentan características histológicas diferentes dependiendo de los genes que se inactiven. Además, estos GEMM pueden usarse para determinar cuáles son los mecanismos moleculares de las alteraciones genéticas implicados en el desarrollo del PDAC. Por otra parte, también nos pueden ayudar a investigar las respuestas a diferentes estrategias terapéuticas (24).

En nuestro laboratorio, el modelo utilizado para el estudio de los tumores de páncreas consiste en un doble transgénico que expresa la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen de la Elastasa (Elas-tTA/tetO-Cre) regulado negativamente por tetraciclina. Este modelo nos permite también controlar el tiempo de expresión de la Cre recombinasa y del oncogén *K-Ras*. Así, en ausencia de doxyciclina, la expresión del oncogén *K-Ras* se produce a partir de estadios embrionarios E16.5. Este modelo da lugar a lesiones PanIN que progresan a PDAC en un porcentaje reducido de ratones (20-30%). Si mantenemos a los ratones con doxyciclina, la enzima Cre recombinasa está inactiva y es al retirar la doxyciclina a p60 cuando conseguimos la expresión de la Cre y por tanto la del oncogén *K-Ras*^{G12V} en la etapa adulta. En esta etapa la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} no da lugar al desarrollo de lesiones ni siquiera en ausencia de supresores tumorales como *p53* y *p16* o *p19* (39). En el adulto es necesario la cooperación de la pancreatitis (aguda o crónica) para que aparezcan los diferentes grados de lesiones PanIN y PDAC (39).

3.- Introducción

La pancreatitis causa un daño en el tejido generando una respuesta regenerativa e inflamatoria mediada principalmente por linfocitos T. Esta inflamación induce la expresión de marcadores embrionarios como Pdx1 y activa las rutas de Notch y Hedgehog. Además, se ha visto que *K-Ras* induce una desdiferenciación de la regeneración de las células acinares por un mecanismo de disminución de β -catenina (105). Por tanto, la contribución de la pancreatitis a la generación de lesiones PanIN y PDAC puede estar mediada por la reprogramación de otras células que no sean las células acinares adultas, pero que a su vez sean sensibles a la inflamación. Es posible que el daño tisular movilice grupos de células progenitoras para restaurar la homeostasis. Si esto es así, las células progenitoras podrían ser las susceptibles de la transformación a través de *K-Ras* permitiendo la aparición de estructuras de tipo ductal como sucede cuando se forman las lesiones PanIN. Este proceso podría ser similar a la formación de PDAC cuando se expresa el oncogén *K-Ras* desde estadios embrionarios (119). No se puede excluir que la ceruleína pueda tener otros efectos en distintas células diana para estimular la proliferación (28). Es necesario realizar más estudios que nos ayuden a determinar como la respuesta inflamatoria contribuye a la formación de PDAC.

La expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} en pulmón da lugar al desarrollo de adenomas y adenocarcinomas. En nuestro laboratorio, para el estudio de tumores de pulmón, el modelo knockin de *K-Ras*^{G12V} se cruzó con una estirpe, *RERTn* (40) que expresa de forma ubicua e inducible la recombinasa CreERT2, bajo el promotor del gen de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II, el enzima responsable de la síntesis de ARN mensajero (13). Esta recombinasa Cre se encuentra fusionada al dominio de unión a hormonas esteroideas del receptor de estrógenos (ER), previamente modificado (ERT2) de manera que impide su unión a los esteroides endógenos. La unión de determinados esteroides sintéticos, como el 4-OH-Tamoxifeno (4-OHT), induce un cambio conformacional en el dominio ERT2 volviendo activa a la recombinasa Cre. La expresión postnatal endógena del oncogén *K-Ras*^{G12V} en esta estirpe generada después del tratamiento con 4-OHT da lugar, en todos los animales, a la aparición de múltiples adenomas y adenocarcinomas pulmonares que provocan la muerte de los mismos por problemas respiratorios (126). Este modelo nos permite estudiar la iniciación y progresión del cáncer de pulmón.

Para inducir la transformación tumoral en intestino es necesario la pérdida del locus *Apc*, que genera un aumento en la expresión de β -Catenina (141). El oncogén *K-Ras* no es capaz por si solo de inducir tumores en colon pero coopera con la pérdida de *Apc* acelerando el desarrollo tumoral en intestino (134). Para el estudio de los tumores en intestino el modelo knockin de *K-Ras*^{G12V} se cruzó con el knockout condicional de *Apc* (134) y con una estirpe, *RERTn* (40) que expresa de forma ubicua e inducible la recombinasa CreERT2. La expresión postnatal endógena del

3.- Introducción

oncogén K-Ras^{G12V} junto con la delección de *Apc* en esta estirpe generada después del tratamiento con 4-OHT da lugar, en todos los animales, a la aparición de tumores intestinales.

Objetivos

Los objetivos que nos planteamos con el desarrollo de esta tesis son:

- 1.- El estudio del fenómeno de senescencia como mecanismo de protección al desarrollo tumoral.
- 2.- El estudio del papel de supresores tumorales (*p16/p19* y *p53*) y de la pancreatitis en el desarrollo tumoral.
- 3.- El estudio del papel de *Egfr* en la iniciación tumoral en páncreas, pulmón e intestino.
- 4.- El estudio del posible uso de *Egfr* como diana terapéutica.

Materiales y métodos

5.1 Líneas de ratón genéticamente modificadas empleadas en este trabajo

El modelo de ratón de cáncer de páncreas, se generó mediante el cruce del knockin condicional del gen *K-Ras* ($K-Ras^{+/LSLG12V_{geo}}$) generado en nuestro laboratorio, con la línea bitransgénica *Elas-tTA/tetO-Cre*. Los transgénicos *Elas-tTA* y *Teto-Cre* fueron cedidos amablemente por el Dr. Grippo y el Dr. J.I Gordon, respectivamente, aunque actualmente están sin publicar. Para simplificar, se designó como *ElasK-Ras^{G12V}* (40). Para generar los modelos de tumores de intestino y de pulmón el knockin condicional del gen *K-Ras* ($K-Ras^{+/LSLG12V_{geo}}$) también se cruzó con la estirpe *RERT^{ert/ert}* también generada en nuestro laboratorio (40). Otras líneas utilizadas en este estudio incluyen: *Egfr^{lox/lox}* (107), *p16/p19^{lox/lox}* (77), *p53^{lox/lox}* (68) y *APC^{lox/lox}* (141). Se generaron, mediante cruces, las diferentes líneas de ratón, con sus correspondientes controles, tanto en heterocigosis, como en homocigosis:

La línea utilizada para estudiar el papel de *Egfr* en tumores de pulmón presentaba un fondo genético mixto de las cepas: C57BL/6J, 129/Sv y CD1

$$RERT^{ert/ert}, K-Ras^{G12V}, Egfr^{lox/lox}$$

La línea utilizada para estudiar el papel de *Egfr* en tumores de intestino presentaba un fondo genético mixto de las cepas: C57BL/6J, 129/Sv y CD1

$$RERT^{ert/ert}, APC^{lox/lox}, K-Ras^{G12V}, Egfr^{lox/lox}$$

Las líneas utilizadas para estudiar el papel de *Egfr* en tumores de páncreas presentaban un fondo genético mixto de las cepas: C57BL/6J, 129/Sv, CD1 y FVB

$$\begin{aligned} &ElasK-Ras^{G12V}, Egfr^{lox/lox} \\ &ElasK-Ras^{G12V}, Egfr^{lox/lox}, p53^{lox/lox} \\ &ElasK-Ras^{G12V}, Egfr^{lox/lox}, p16/p19^{lox/lox} \end{aligned}$$

5.2 Estabulación y experimentación

Todos los ratones utilizados en este trabajo se han mantenido en el animalario del CNIO, según las recomendaciones de FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) y siguiendo la legislación vigente en la Unión Europea. Todos los experimentos realizados con ratones fueron previamente aprobados por los Comités de Bioética y Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III. En el animalario del CNIO los animales están sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. La iluminación durante el ciclo diurno procede de lámparas fluorescentes que emiten luz blanca (TLD 36W/840 y TLD 58W/840). Los animales tienen

acceso libre a la dieta granulada las 24 horas del día, aunque el 80% del alimento suele ser consumido durante el periodo de oscuridad.

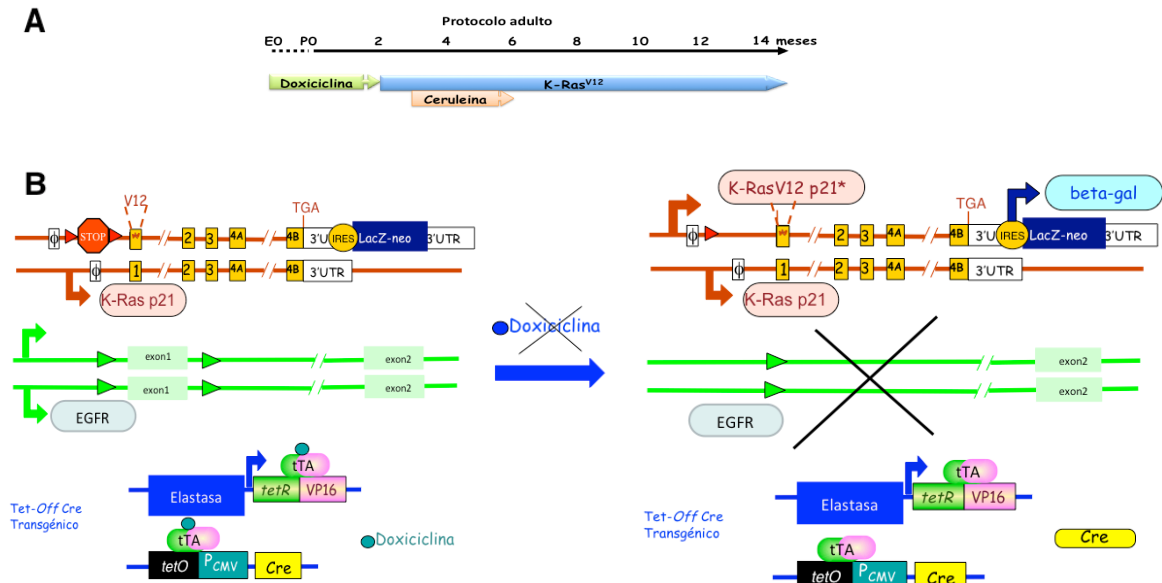
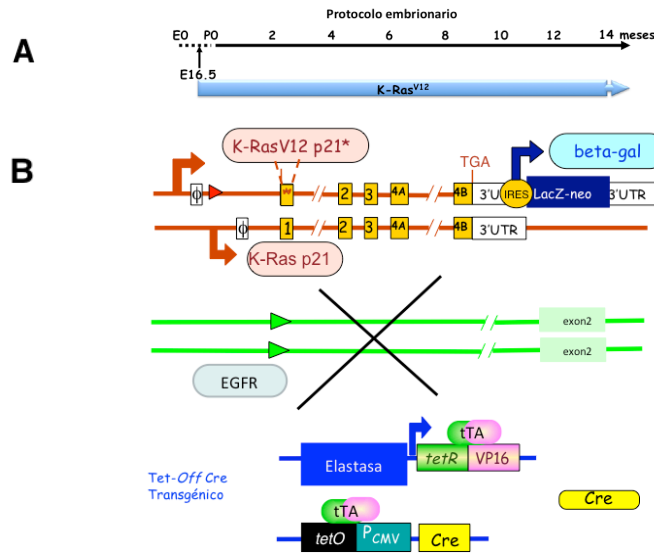
5.3 Tratamientos de los animales

5.3.1 Administración de doxiciclina y ceruleína

El modelo de ratón modificado genéticamente utilizado en esta tesis para el estudio de los tumores pancreáticos fue generado mediante el cruce de nuestro knockin condicional del oncogén *K-Ras*^{+/-LSLG12V_{geo}} (40) con el ratón bitransgénico *Elas-tTA/tetO-Cre*, que expresa la enzima Cre recombinasa bajo el control del promotor específico de tejido, elastasa, en un sistema dependiente de tetraciclina de tipo Tet off (41). El ratón generado mediante este cruce lo denominaremos *ElasK-Ras*^{G12V}. En ausencia de doxiciclina, en el denominado protocolo embrionario (Figura 8), la enzima Cre recombinasa se expresa a partir de estadios tardíos del desarrollo embrionario (E16.5). La enzima reconoce la secuencia de los sitios LoxP que flanquean el casete de parada transcripcional insertado justo delante del exón 1, que contiene la mutación en el codón 12 (G12V), permitiendo así la transcripción del oncogén *K-Ras*^{G12V}. Es un sistema transgénico controlado por el promotor de la elastasa, y la recombinación se consigue en un 30% de las células acinares del páncreas. Para poder seguir la expresión del alelo oncogénico, el extremo 3'UTR (untranslated region) porta un casete reportero IRES-β-geo (Intraribosomal Entry Site- β-galactosidase-neomycine Resistance) que permite la expresión bicistónica de la proteína de fusión β-geo (β-galactosidasa y casete de resistencia a neomicina). De esta forma se consiguió un modelo de ratón de expresión inducible del oncogén *K-Ras* y monitorizable por tinción específica de LacZ. La Cre recombinasa permite la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} y la delección de otros genes al mismo tiempo como sucede en el caso de *Egfr*, *p16/p19*, *p53*, sólo en las células acinares del páncreas (Figura 8 y 9). Si se administra doxiciclina a los animales, protocolo adulto (Figura 9), la Cre recombinasa no se expresa. Al retirar este tratamiento del agua de bebida a los dos meses de edad, se logra la expresión de la enzima Cre recombinasa, en etapas adultas.

La doxiciclina (Sigma) se les administra en el agua de bebida a los ratones a una dosis de 2 mg/ml junto con sacarosa (5% w/v), usando biberones oscuros ya que es fotosensible, además se cambia cada dos días, para que sea efectiva. Este tratamiento se realiza en hembras preñadas desde el momento de la concepción hasta el nacimiento de las crías y se continua el tratamiento de los recién nacidos hasta que alcanzan los dos meses de edad (edad a la que se les considera adultos). Para la inducción de tumores en el protocolo adulto es necesario la cooperación del oncogén *K-Ras* con la inducción de pancreatitis crónica (41). Esto se consigue por la inyección por vía intraperitoneal de ceruleína disuelto en suero fisiológico (enzima sintética análoga a la

colecistoquinina), desde los 3 hasta los 6 meses de edad (125 µg/Kg, 5 días por semana, Sigma).



5.3.2 Administración de 4-Hidroxitamoxifen (4-OHT)

Para la inducción de **tumores de pulmón** del tipo NSCLCs (Non Small Cell Lung Carcinomas), los ratones $K-Ras^{+/LSLG12V_{geo}};RERT^{ert/ert}$ (designados como $RERTK-Ras^{G12V}$ para simplificar) con los alelos salvajes o floxeados de *Egfr*, se tratan a los 21 días después de su nacimiento (P21) con una inyección de 4-OHT (Sigma) a una dosis 0,5 mg/ml en aceite de maíz para permitir al mismo tiempo la expresión del oncogén $K-Ras^{G12V}$ y la inactivación del alelo floxeado de *Egfr*.

Para la inducción de los **tumores intestinales** los ratones $K-Ras^{+/LSLG12V_{geo}};Apc^{lox/lox};RERT^{ert/ert}$ (nombrados como $RERTK-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox}$ para simplificar) que llevan el alelo salvaje o floxeado de *Egfr*, se tratan a los 21 días después de su nacimiento (P21), durante dos semanas con tres inyecciones por semana de 4-OHT (Sigma) a una dosis 0,5 mg/ml en aceite de maíz, permitiendo así la expresión del oncogén $K-Ras^{G12V}$ y la inactivación de los alelos floxeados de *Apc* y *Egfr* al mismo tiempo.

Para prepararlo se pesan 50 mg de 4-OHT (Sigma) en 10 ml de aceite de maíz. Esta mezcla se sonica (Sonicador Branson modelo 102C) en 2 pulsos de 3 minutos a 70% de amplitud, en hielo (para evitar la inactivación del compuesto por el calor). En este punto se puede almacenar, teniendo en cuenta que cada vez que quiera usarse debe ser sonicada de nuevo. La dosis administrada a cada ratón por vía intraperitoneal es de 0,5 mg/ml.

5.3.3 Tratamiento con Erlotinib

El tratamiento oral con Erlotinib (LC laboratories), se llevó a cabo en ratones $ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}$ de 6 semanas de edad mediante una cánula esofágica a una dosis de 100 mg/Kg disuelto en el vehículo (0.5% methylcelulosa y 0.1% Tween80). El tratamiento se administró diariamente durante 4 semanas. Los ratones control fueron tratados a la vez con el vehículo.

5.3.4 Tratamiento con Sulindac

El Sulindac es un fármaco antiinflamatorio que actúa frente a las enzimas COX-1 y COX-2. Se trata a los animales durante tres meses después del tratamiento con ceruleína. Preparamos una solución de 180 mg de Sulindac (Sigma) disuelto en 0,2μM de tampón fosfato a pH 7,2 (Sulindac es insoluble si no se alcanza dicho pH). Se utilizan biberones oscuros para su administración ya que el Sulindac es un compuesto fotosensible. Además, los biberones se cambian cada semana porque el compuesto pierde su actividad durante este tiempo.

5.4 Extracción de ADN y genotipado del ratón

El ADN se obtiene de una pequeña sección de la cola del ratón siguiendo el protocolo de extracción con sal. Para ello las colas se incuban al menos 12 horas a 55°C en 500 µl de tampón de lisis compuesto por 2% TrisHCl (1 M) pH 8.0, 2% NaCl (5 M), 0.5% SDS, 2% EDTA (0.5 M) pH 8 y 40 µg de proteinasa K.

Después de la digestión con el tampón de lisis y la Proteinasa K, se añaden 300 µl de una solución saturada de NaCl manteniéndose 15 minutos en hielo para ayudar a la degradación de la fracción proteica del ADN. Posteriormente, se centrifugan a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo al que se añade un volumen de isopropanol para precipitar el ADN. Tras la centrifugación a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C se descarta el isopropanol. Más tarde, el ADN se lava con etanol al 70% y se centrifuga en las mismas condiciones durante 10 minutos. Después de eliminar los restos de etanol por aspiración, se seca completamente el precipitado de ADN durante 2 minutos a 42°C y finalmente se resuspende en agua estéril.

5.4.1 Genotipado por PCR

La mezcla de PCR por muestra, contenía: Tampón de la Polimerasa Taq 1X (Ecogen), 1.25 µl MgCl₂ 25mM, 0.5 µl dNTPs 10mM, 0.1 µl BSA 10 mg/ml, 0.1 µl Polimerasa Taq (5 u/µl EcoTaq, Ecogen), cebadores 1:1 ó 2:1:1 (1 µM, Sigma), 1µl de ADN (50 ng/µl) y se completa con agua MiliQ hasta un volumen final de 20µl.

Los cebadores empleados fueron:

K-Ras^{LSLG12V_{geo}}:

-Kras2f-16B5: 5' CGTCCAGCGTGTCTAGACTTTA 3'

-Kras2r-15B9: 5' ACTATTTCATACTGGGTCTGCCTT 3'

-NeoF-2B1: 5' TGACCGCTTCCTCGTGCTT 3'

Condiciones de PCR: 94°C 1 minuto. 35 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 7 minutos. 15B9-2B1: 390 pb alelo mutado, 16B5-15B9: 240 pb alelo silvestre.

Elastasa-tTA:

-EI-1: 5' CGCCCAGAAGCTAGGTGTAGAGCA 3'

-EI-2: 5' GCCCCACAGCGCTGAGTGCATATAA 3'

5.- Material y Métodos

Condiciones de PCR: 92°C 2 minutos. 34 ciclos de amplificación (92°C durante 45 segundos, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 5 minutos. El-1-El-2 340 pb para el transgén.

RERT:

-Polr2aR_10B6: 5'CCTCTCTGAGCCTCAATTAAGCAG^{3'}

-ESRF1f_10B7: 5'TGAGTAACAAAGGCATGGAGCA^{3'}

-Polr2aF_14B5: 5'CCAGATGACAGCGATGAGGA^{3'}

Condiciones de PCR: 92°C 1 minuto. 34 ciclos de amplificación (92°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 10 minutos. El Polr2aF_14B5-Polr2aR_10B6: 480 pb para el alelo salvaje y Polr2aR_10B6-ESRF1f_10B7: 390 pb para el transgén.

APC:

-APCP3: 5'GTTCTGTATCTAGGAAAGATAGGTGGTC^{3'}

-APCP5: 5'GAGTCAGGGGTCTCTGTCGTCTCAGTAAA^{3'}

Condiciones de PCR: 95°C 3 minutos. 30 ciclos de amplificación (95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 5 minutos. APCP3-APCP5: 226 y 250 pb para los alelos salvajes y los deleccionados respectivamente.

Tet-Cre:

-Teto-cre 1: 5'CCGGTTATTCAACTTGCACC^{3'}

-Teto-cre 2: 5'CTGCATTACCGGTCGATGCAAC^{3'}

Condiciones de PCR: 94°C 3 minutos. 39 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos, 72°C durante 2 minutos) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 5 minutos. Teto-cre 1 - Teto-cre 2: 149 pb para el transgén.

EGFR:

-Egfr-F15C9: 5'CTCTTGACTGCTGCCAACTTAG^{3'}

-Egfr-R7B9: 5'GAGATCTCCACACTTCCAGGTCA^{3'}

Condiciones de PCR: 94°C 1 minuto. 35 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 7 minutos. EgfrF15C9- EgfrR7B9: 350 y 550 pares de bases para los alelos salvajes y floxeados, respectivamente.

p16/p19:

-INK4aloxF: 5' CCTGACTATGGTAGTAAAGTGG^{3'}

-INK4aloxR: 5' ACGTGTATGCCACCCTGACC^{3'}

Condiciones de PCR: 94°C durante 2 minutos. 30 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 50 segundos) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 5 minutos. Los cebadores usados para la detección del sitio 3' loxP situado en Csp451 INK4aloxF- INK4aloxR 390 y 290 pb para los alelos floxeados y salvajes respectivamente.

p53:

-1p53F: 5' CACAAAAACAGGTAAACCCAG^{3'}

-1p53R: 5' GAAGACAGAAAAGGGGAGGG^{3'}

Condiciones de PCR: 94°C 2 minutos. 30 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 50 segundos) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 5 minutos. 1p53F-1p53R: 370 y 288 pb para la detección de los alelos floxeados y salvajes, respectivamente.

5.5 Histopatología e Inmunohistoquímica

5.5.1 Obtención de muestras

Los animales se sacrifican en los tiempos de estudio correspondientes o cuando presentan signos de enfermedad, mediante CO₂ y los diferentes órganos se procesan siguiendo distintos pasos dependiendo de su uso posterior (ver a continuación para cada procedimiento).

5.5.2 Tinción X-gal en cortes de criostato

Una vez sacrificado el animal se procede a la disección de los órganos, en este caso el páncreas, pulmón e intestino. Después de la disección se lavan con PBS (Phosphate Buffer Solution) (Gibco) para eliminar los restos de sangre, y se seca bien antes de embeber los órganos en una solución líquida de OCT (*Tissue Tek, Sakura*) contenido en un molde (*Tissue Tek, Sakura*). Posteriormente se congelan depositándolos sobre nieve carbónica y se almacenan a -80°C hasta su procesamiento.

Nuestro modelo de ratón presenta la ventaja de que el extremo 3' del locus de *K-Ras* contiene un casete βgeo (β-galactosidasa fusionada a un casete de resistencia a neomicina), el cual está precedido por una secuencia IRES (Sitio Interno de Entrada del Ribosoma). Con este sistema bicistónico se co-expresa el oncogén y la β-galactosidasa. De esta manera mediante la

tinción X-gal se pueden identificar las células que expresan el oncogén presenten o no alteración histológica y seguir dicha expresión tanto en el tejido normal como en las lesiones preneoplásicas (PanIN) hasta la formación del tumor.

Los cortes de los órganos realizados en el criostato (*Vacutomer, Dako*) de 10 μ m de grosor se sumergen en una solución fijadora (0.2% glutaraldehído, 2 mM $MgCl_2$, 0.02% NP-40, 0.01% deoxicolato sódico) durante 10 minutos. Después, se realizan 3 lavados de 10 minutos en una solución compuesta por: 0.1 M tampón fosfato pH7.2, 2 mM $MgCl_2$, 0.02% NP-40, 0.01% deoxicolato sódico. Posteriormente se incuban a 37°C durante 48 horas en la solución de tinción [tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, 2 mM $MgCl_2$, 0.02% NP-40, 0.01% deoxicolato sódico, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ y 1 mg/ml X-gal].

Una vez teñidos los criocortes se realizan 3 lavados en PBS, de 10 minutos cada uno, y se contratiñen con *Nuclear Fast Red*. Posteriormente, la muestra se deshidrata pasándola por una serie de baños de un minuto de duración cada uno de ellos, de concentraciones crecientes de etanol (dos baños en etanol al 70% y otro de la misma duración, en etanol al 98%) para terminar con un baño en xilol de 5 segundos y su posterior montaje con Pertex^R (Histolab).

5.5.3 Tinción de senescencia asociada a β -galactosidasa (SABG)

Los criocortes se obtienen de la misma forma que en la sección anterior (5.5.2). Se fijan en 2% de formaldehído y 0,2% de glutaraldehído diluidos en solución PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fijación se para mediante dos lavados de 2 minutos cada uno con PBS para posteriormente teñir la muestra con la solución de tinción compuesta por: 40 mM de ácido cítrico diluido en PBS a un pH de 6.0, 0,2 mM de $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ y 1 mg/ml X-gal disuelto en dimetilformamida a 37°C un mínimo de 16 horas en oscuridad. Una vez teñidos se realizan 3 lavados en PBS de 10 minutos y se contratiñen como se ha explicado anteriormente (5.5.2). La aparición del color azul se monitorizaba al microscopio.

5.5.4 Tinciones de X-gal de explantes celulares y de células embebidas en colágeno

Esta tinción se realiza en la placa de cultivo que contienen los discos de colágeno o los explantes celulares. Las células se fijan en las placas o en los discos de colágeno con una solución de glutaraldehído al 0,025% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizan 3 lavados de 10 minutos de duración cada uno con PBS, también a temperatura ambiente. Después, las muestras se tiñen con una solución compuesta por: tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, 2 mM $MgCl_2$, 0.02% NP-40, 0.01% deoxicolato sódico, 30 μ M $K_3Fe(CN)_6$, 30 μ M $K_4Fe(CN)_6$ y 1 mg/ml X-gal. Las muestras se cubren con esta tinción al menos 12 horas a 37°C en oscuridad.

5.- Material y Métodos

Para la realización de las fotos de los explantes de cultivos celulares se utilizó el microscopio de lente invertida PALM microbeam ZEISS Axio Observer (Carl Zeiss). Para las fotos de las discos de colágeno se utilizó el microscopio Olympus CK30.

5.5.5 Tinciones de hematoxilina/eosina e inmunohistoquímica

Tras la necropsia, los órganos de interés (páncreas, pulmón e intestino) se fijan en 10% formalina. Posteriormente, se embeben en parafina y se realizan 100 secciones seriadas de 3 µm de grosor; y 1 corte de cada 10 se tiñe con hematoxilina/eosina (H/E). Los cortes consecutivos a la H/E se utilizan para hacer las tinciones de inmunohistoquímica que se requieren para cada caso. Para la realización de la inmunohistoquímica es necesario desparafinar la muestra (a 55°C, al menos 12 horas). Posteriormente, se realiza la recuperación antigénica incubando la muestra con citrato sódico 10 mM pH 6, a 95°C durante 20 minutos. A continuación, se tratan con peróxido de hidrógeno (diluido al 3% en metanol) a temperatura ambiente durante 5 minutos para eliminar la actividad de peroxidasa endógena del tejido. Se incuban con el anticuerpo primario correspondiente y luego con el secundario biotinilado. Finalmente, las muestras se incuban con la mezcla ABC de Vectastain (Elite) y se revelan con diaminobencidina. Se contratiñen con hematoxilina, se deshidratan y se montan para su posterior conservación, siguiendo el mismo método (5.5.2).

Los anticuerpos primarios empleados, casa comercial de los mismos y dilución empleada son: β-Catenina (1:750, Santa Cruz Biotechnology, Sc-1496), pAkt (pS473) (1:175, EP2109Y, Epitomics 2118-1), Egfr (1:100, Epitomics 1902-1), Spc (1:175, Millipore, AB3786) y pStat3 (Tyr705) [1:100, (D3A7) Cell Signaling Technology, 9145].

Para las muestras humanas se usaron microarrays de tejidos (TMAs) que contienen PDAC recogidas de biopsias de 12 pacientes (amablemente cedidas por el Dr. M. Hidalgo, CNIO) y páncreas normal procedente de autopsias (amablemente cedidas por el Dr. F.X. Real, CNIO).

Para la realización de las imágenes, la preparación se escanea usando el microscopio: Mirax Viewer release 1.8. Posteriormente se procesan las imágenes con el programa: Pannoramic Scan 150; 1.14 3D Histech.

5.6. Microdissección por láser y análisis por PCR de la delección de EGFR

5.6.1 En muestras de OCT

Después de la tinción de X-gal en las muestras de páncreas y la contratinción (material y métodos 5.5.2) sin pasarlas por xilol, se procede a la microdissección por láser utilizando un microscopio PALM microbeam ZEISS Axio Observer (Carl Zeiss). Con este microscopio se realiza la microdissección por láser de 7000-10000 células acinares azules (tinción X-gal positiva) es decir, que expresan el oncogén *K-Ras*, y como control negativo se microdissecciona la misma cantidad de células acinares blancas (tinción X-gal negativa), que no expresan el oncogén.

El ADN procedente de esas células se extrae mediante incubación de las mismas en agitación ligera durante 16 horas a 55°C en 25 µl tampón NIDD: (50 mM KCl, 10 mM TrisHCl pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20) junto con 6 µl de de Proteinasa K a una concentración final en la mezcla de 5 mg/ml. Posteriormente, la Proteinasa K se inactiva a 99°C durante 5 minutos para proceder a la realización de la PCR utilizando 3 µl de esta solución como ADN molde.

La mezcla de PCR está compuesta por: Tampón de la Polimerasa Taq 1X (Ecogen), 2,5 µl, 1 mM MgCl₂, 0,5 µl dNTPs 10mM, 0.1 µl Polimerasa Taq (5 u/µl EcoTaq, Ecogen), cebadores 1:1 (1 µM, Sigma), se completa con agua MiliQ hasta un volumen final de 25µl.

Los cebadores empleados son:

Delección de *p16/p19*:

-INK4aΔF: 5' TTGGGAGGCACACTTTCTTG^{3'}

-INK4aΔR: 5' ACGTGTATGCCACCCTGACC^{3'}

Condiciones de PCR: 94°C 5 minutos. 30 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos, 72°C durante 50 segundos) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 10 minutos. Los cebadores reconocen la delección de los exones 2 y 3 (INK4aΔF- INK4aΔR: 280 pb para el alelo delecionado). Para detectar el alelo salvaje y floxeado se utilizaron las condiciones de PCR explicadas en el apartado 5.4.1 de material y métodos.

Delección de *Egfr*:

-EgfrΔFv: 5' AGCAGCCTCCCTCCTCTTCTTCC^{3'}

-EgfrΔRv: 5' GTTGGGTGAGCCTGTTACTTGTGC^{3'}

Condiciones de PCR: 94°C 5 minutos. 30 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos), y finalmente el ciclo de

elongación a 72°C durante 10 minutos. El fragmento amplificado tiene un tamaño de 250 pares de bases. Para detectar el alelo salvaje y floxeado se utilizaron las condiciones de PCR explicadas en el apartado 5.4.1 de material y métodos.

Delección de *p53*:

-1F: 5' CACAAAAACAGGTTAAACCCAG 3'

-10R: 5' GAAGACAGAAAAGGGGAGGG 3'

Condiciones de PCR: 94°C 2 minutos. 30 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos, 72°C durante 50 segundos) y finalmente un ciclo de elongación a 72°C durante 5 minutos 1F-10R: 612 pares de bases para la detección de la delección del exón 2 hasta el 10. Para detectar los alelos salvajes y floxeados se utilizaron las condiciones de PCR explicadas en el apartado 5.4.1 de material y métodos.

5.6.2 En lesiones de muestras de parafina

Se realiza la tinción de H/E sin montar las muestras, se procede a la microdissección de 200-400 células de las lesiones PanIN de diferentes grados. En el caso de las muestras de pulmón e intestino se microdisseccionan tumores aislados.

El tampón de lisis de ADN y la mezcla para PCR utilizado son los indicados en el apartado anterior (5.6.1), pero en este caso se realizó una PCR anidada. Los cebadores externos utilizados fueron:

-EgframpIFv: 5' TCCATTCAATCCAAAGTCTCTGAG 3'

-EgframpIRv: 5' TGTGATGAGGGTCCCTGA 3'

Dan lugar a un producto de PCR de 234 y 253 pares de bases para los alelos salvajes y floxeados de *EGFR*, respectivamente.

Se utilizan 2 µl del producto de PCR como ADN molde para la siguiente reacción de PCR, como cebadores internos:

-EgfrFV1: 5' AGCAGCCCTGACTTTGCA 3'

-EgfrRV2: 5' CTTGGTCCCCTAATTTAGGCC 3'.

Esta PCR da lugar a unos fragmentos de 131 y 150 pares de bases que determinan los alelos salvajes y los alelos floxeados, respectivamente. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 94°C 1 minuto. 35 ciclos de amplificación (94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y un paso de elongación final de 72°C durante 10 minutos.

5.7 Cultivos celulares

5.7.1 Ensayos de transdiferenciación celular

El día anterior a la realización del cultivo se prepara la placa de 24 pocillos con un recubrimiento de colágeno. Para este proceso se mezclan 6 ml de colágeno de cola de rata (BD Biosciences) que durante todo el proceso se mantiene en hielo, 732 μ l de medio RPMI 10X y aproximadamente 0,6 ml de NaOH 0,34 N (la cantidad de hidróxido de sodio dependerá del pH del colágeno, variable según el lote) a pH final de 7. De esta mezcla se añade 250 μ l a los pocillos, distribuyéndola para cubrir el pocillo. La placa se introduce en el incubador a 37°C para que gelifique el colágeno.

Para la obtención de las células acinares se sacrifica el ratón (entre 6 y 8 semanas de edad). Se extrae el páncreas que se mantiene a 4°C en HBSS (Hanks Buffer Salt Solution). Se realiza primero la disgregación mecánica del páncreas (en esterilidad) con un bisturí. Después, se pasa el páncreas a un tubo con 5 ml de HBSS y 0,2 mg/ml de collagenasa P (Roche) para su posterior disgregación enzimática. Tras incubar en un baño a 37°C durante 10 minutos con agitación vigorosa cada 2 minutos, el proceso enzimático se para pasando la muestra a hielo y añadiendo 5 ml de una solución de HBSS con 5% de FBS (solución de lavado). Se centrifuga 2 minutos a 2000 rpm para eliminar los restos celulares a temperatura ambiente. Se quita el sobrenadante y el pellet celular se lava 3 veces más con 10 ml de la solución de HBSS con 5% de FBS. Tras el tercer lavado, se quita el sobrenadante y se resuspende el pellet en 5 ml de la solución de lavado. Esta resuspensión se pasa por un filtro de 100 μ m de diámetro y para ayudar a la completa filtración se añaden 5 ml de la solución de lavado. Esta suspensión filtrada se coloca muy despacio sobre 20 ml de una solución de HBSS con 30% de FBS, de tal forma que se formen dos fases. Posteriormente, se centrifuga durante 2 minutos a 1000 rpm. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 4 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina, 0,1 mM piruvato, 0,1 mg/ml inhibidor de tripsina y 1 μ g/ml de dexametasona. Esta suspensión se mezcla con 3 ml de la solución de colágeno de cola de rata (suplementada con 0.6 ml de RPMI 10X y la cantidad necesaria de NaOH para obtener pH 7) preparada en ese mismo momento. Por último, 500 μ l de esta mezcla se siembra sobre los pocillos previamente recubiertos de colágeno el día anterior. Una hora después de sembrar las células se le añade el mismo medio suplementado con 0,025 mg/ml de heparina (que actúa como cofactor de los factores de crecimiento añadidos) y 50 ng/ml de cada uno de los factores de crecimiento (EGF, Epidermal Growth Factor o TGF α , Transforming Growth Factor). Este medio se cambia cada dos días y se mantiene en cultivo desde el día 0 (día en el que se realiza la siembra) hasta el día 5 en el que se realiza el conteo de los ductos con la ayuda de un microscopio Olympus CK30 con objetivo de 20 aumentos. Las fotos de los ductos

fueron realizadas el día 5 de cultivo con el microscopio Nikon Eclipse Ti-U. Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el programa NIS elements BR.

Se toman muestras los días 0 y 5 de cultivo para detectar la expresión del oncogén mediante la tinción de X-gal en la placa y para la realización de las diferentes tinciones por inmunohistoquímica se embeben los discos de colágeno en parafina. Se siguen los protocolos habitual descritos en los apartado 5.5.4 y 5.5.5, respectivamente.

5.7.2 Obtención de explantes de adenocarcinomas pancreáticos de ratón

Durante la realización de la necropsia se procedió a aislar macroscópicamente secciones de tumores pancreáticos de aproximadamente 3 mm de diámetro que se mantienen en medio de cultivo DMEN en ausencia de suero y antibióticos para su posterior procesamiento en la sala de cultivos.

Se realiza la disgregación mecánica del tumor, seguida de una disgregación enzimática en tubo cónico de 50 ml con una solución de 5 ml HBSS suplementado con Colagenasa P (Roche) a una concentración de 0,1 mg/ml y se incuba a una temperatura de 37°C durante 30 minutos con agitación moderada en baño.

La inactivación de la Colagenasa P se realiza añadiendo 10 ml de una solución de HBSS suplementada con 5% de FBS. Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, el precipitado celular obtenido se lava con 10 ml de HBSS centrifugando en las mismas condiciones. Se retira el sobrenadante y las células son resuspendidas en medio de cultivo DMEN suplementado con 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina. Por último, se siembra en una placa de 10 cm y se mantiene en el incubador a 37°C durante 48 horas. Pasado este tiempo se recoge el sobrenadante con los restos celulares no adheridos y se centrifuga a 980 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y el pellet se siembra en una placa de 10 cm con medio de cultivo DMEN suplementado con 10% FBS, (2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomicina) y 75 µg/ml de geneticina. Este último antibiótico permite seleccionar en cultivo las células que expresan el alelo *K-Ras*^{G12V}, debido al casete de resistencia a neomicina que porta el alelo mutado. Además, a esta concentración la geneticina es tóxica para los fibroblastos. Se realizan los siguientes pases cuando las células alcanzan una confluencia del 75% y a partir del tercer pase se realiza una tinción de X-gal para verificar la completa selección de las células tumorales que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} para su posterior congelación y almacenamiento en tanques de nitrógeno líquido. Todos los estudios se realizan usando los explantes entre pases 5 y 8.

5.- Material y Métodos

Se utilizaron 4 líneas diferentes de explantes de ratón, pertenecientes a los siguientes genotipos:

-*ElasK-Ras*^{G12V}

-*ElasK-Ras*^{G12V}; *p53*^{-/-}

-*ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{-/-}

-*ElasK-Ras*^{G12V}; *p53*^{-/-}; *Egfr*^{-/-}

El medio de cultivo empleado para mantener estos explantes fue el siguiente: DMEN suplementado con 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycinay 75 µg/ml de geneticina. Nótese que los genotipos ^{-/-} proceden de los alelos condicionales delecionados confirmados mediante PCR tras establecer el cultivo.

5.7.3 Líneas tumorales humanas utilizadas

Las líneas celulares humanas establecidas de PDAC usadas son comerciales y proceden de la ATCC (American Type Culture Colection). AsPC1, CFPAC, IMIMPC-2 fueron facilitadas por el Dr. F:X Real y BxPc3 (Tabla 2) por el Dr. Manuel Hidalgo.

Líneas celulares	Mutaciones			
	<i>K-RAS</i>	<i>P53</i>	<i>INK4a</i>	<i>DPC4</i>
AsPc1	G12D	CML	CML	No
CFPAC	G12V	Metilado	Mutado	Deleción
IMIMPC-2	G12D	Deleción	Mutado	No
MIAPaCa	G12C	Deleción	Mutado	No
PANC1	G12D	Deleción	Mutado	No
SKPC	G12V	Metilado	Mutado	Deleción
BxPc3	Salvaje	Mutado	Mutado	Mutado
T3M4	Salvaje	Metilado	Mutado	No

Tabla 2: Resumen de las líneas tumorales humanas utilizadas. Principales mutaciones descritas en estas líneas en los genes *K-RAS*, *P53*, *INK4a* y *DPC4*.

CML: Cambio del Marco de Lectura

5.7.4 Transfecciones e infecciones lentivirales

Para la generación de los lentivirus se introduce el ADN exógeno en células 293T. Este proceso se realiza mediante el uso de Jet-primeTM (Polyplus transfection) basado en una formulación no-liposomal que es estable en presencia de suero y antibióticos. Para la generación de lentivirus, se cotransfectaron las células 293T sembradas a 75% de confluencia en placas de 10 cm de diámetro, con 5 µg del vector lentiviral control de interés y los tres plásmidos [pLP1

(1.3 µg), pLP2 (1.9 µg), pLPVSVG (1.65 µg)] que proporcionan los genes de empaquetamiento en *trans*. Para los experimentos de eliminación de la expresión de los diferentes genes en estudio se emplearon los shRNAs (Lentiviral Mission shRNA plasmids) desarrollados por Sigma, que mejor eliminan la expresión de los genes de interés. Se usaron para todos los estudios de shRNA dos secuencias para cada gen de manera independiente:

shEgfr de ratón: TRCN0000055218 y TRCN0000055221

shStat3 de ratón: TRCN0000071454 y TRCN0000071456

shEgfr de humano: TRC0000121206 y TRC0000121203

Al día siguiente las células transfectadas se pasan a incubadores de 32°C para favorecer la estabilidad de los lentivirus en el medio de cultivo. 48 horas después de la transfección se recoge el sobrenadante de las células 293T que contiene los virus y se pasa a través de filtros de 0.45 µm para eliminar contaminaciones de células empaquetadoras. Una vez filtrado este sobrenadante se puede congelar a -80°C hasta su utilización o utilizarlo directamente para infectar las células.

Para la infección con los lentivirus generados se retira el medio de cultivo de las células a infectar, sembradas el día anterior a un 50% de confluencia. Se añade todo el sobrenadante viral, al menos 5 ml, más polibrenos (8 µg/ml, Sigma), para aumentar así la unión de la cápside viral a la membrana celular.

Tras la incubación de las células infectadas a 32°C durante 12-16 horas se pasan las placas a un incubador de 37°C y al día siguiente se cambia el medio de cultivo. El nuevo medio contiene puromicina (2,5 µg/ml) para seleccionar las células que han sido infectadas y que expresan los shRNAs, ya que el vector lentiviral presenta resistencia a ese antibiótico. Así, en presencia de puromicina (durante tres días) las células que no se han infectado, y por tanto no tienen resistencia a ese antibiótico se mueren, quedando vivas aquellas que se han infectado. Estas últimas se recogen para ensayos de biología molecular y de proliferación celular.

5.7.5 Ensayos de proliferación celular

Para medir la proliferación celular utilizamos el método MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT1) (Sigma), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazán, un compuesto coloreado de color azul, permitiendo determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular (Francois Denizot y Rita Lang., 1986). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

5.- Material y Métodos

Las células tumorales humanas y los de explantes tumorales de ratón se siembra en placas de 96 pocillos a una confluencia de 1000 células/pocillo y 300 células/pocillo respectivamente. En ambos casos para la realización del ensayo de proliferación, cada dos días, se elimina el medio de cultivo y se incuba durante tres horas a 37°C con 100 µl de la solución MTT1 (1mg/ml en medio de cultivo). Después, se añade 100 µl del reactivo MTT2 (10% SDS y 0.01M HCl), manteniéndose a 37°C hasta el día siguiente, en el que se procede a la lectura de la placa a 544 nm mediante un lector EnVision 2104 (Multilabel Reader, Perkin Elmer, Waltham, USA). Los resultados se normalizan respecto al día 0 (día siguiente de la siembra) y se representan como unidades arbitrarias de absorbancia.

5.7.6 Tratamiento con inhibidores de las líneas celulares

La líneas celulares tumorales humanas y los explantes tumorales de ratón se siembran en placas de 96 pocillos a densidad de 1000 células/pocillo y 300 células/pocillo, respectivamente y se incuban durante 24 horas en medio de cultivo DMEN suplementado con 10% de FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (GIBCO-Invitrogen) antes de añadir el correspondiente inhibidor. Los inhibidores utilizados son:

- Erlotinib (LC laboratories), inhibidor de EGFR (137).
- PD0325901 (Pfizer), inhibidor de MEK (44).
- ETP-46992 (CNIO), inhibidor de PI3K (94).
- PLX4032 (Selleck Chemicals), inhibidor de BRAF^{V600E} (70).
- Sorafenib (Bayer), inhibidor de RAF (62).

Los inhibidores se preparan en DMSO hasta llevarlos a la concentración adecuada descrita en la Tabla 3 para las células tumorales humanas y en la Tabla 4 para los explantes de PDAC de ratón. Los experimentos con inhibidores se realizan por triplicado. Como control se usa la misma cantidad de DMSO utilizada con los inhibidores. El control del DMSO son células con el medio de cultivo habitual. Las células fueron tratadas con el IC₉₀ y el IC₅₀ (concentración necesaria de una droga para inhibir el 90% y 50% del crecimiento celular, respectivamente), Tabla 3 y 4. Los tratamientos tienen una duración de 10-14 días cambiando el medio de cultivo y el inhibidor cada dos días. El ensayo de proliferación celular se realiza utilizando el método de MTT previamente descrito en el apartado 5.7.5.

5.- Material y Métodos

Líneas celulares	Erlotinib		MEK		PI3Kinasa	
	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
AsPc1	>200,0 µM	>200 µM	190,0 µM	>200 µM	0,2 µM	3,4 µM
CFPAC	20,0 µM	>200 µM	22,5 µM	>200 µM	0,2 µM	8,5 µM
IMIMPC-2	>200,0 µM	>200 µM	0,8 µM	>200 µM	0,2 µM	1,6 µM
MIAPaCa	66,8 µM	>200 µM	8,5 µM	>200 µM	0,3 µM	2,0 µM
PANC1	>200,0 µM	>200 µM	>200,0 µM	>200 µM	0,2 µM	1,8 µM
SKPC	70,0 µM	>200 µM	0,5 µM	>200 µM	0,2 µM	1,2 µM
BxPc3	23,5 µM	>200 µM	0,3 µM	>200 µM	0,2 µM	9,6 µM
T3M4	12,2 µM	>200 µM	0,1 µM	>200 µM	0,1 µM	9,4 µM

Tabla 3: Resumen de las dosis IC₅₀ e IC₉₀ de los inhibidores utilizados en las diferentes líneas celulares humanas.

Genotipos de los Explantes celulares	Erlotinib		MEK		PI3Kinasa	
	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
<i>K-Ras</i> ^{G12V}	7,8 µM	50 µM	0,21 µM	2,5 µM	0,4 µM	3 µM
<i>K-Ras</i> ^{G12V} ; <i>p53</i> ^{-/-}	25 µM	50 µM	0,65 µM	45 µM	2 µM	20 µM
<i>K-Ras</i> ^{G12V} ; <i>p53</i> ^{-/-} ; <i>Egfr</i> ^{-/-}	30 µM	35 µM	0,65 µM	8 µM	1,5 µM	7 µM

Tabla 4: Resumen de las dosis IC₅₀ e IC₉₀ de los inhibidores utilizados para tratar los explantes de PDAC de ratón utilizados en esta tesis.

5.8 Análisis de proteínas

5.8.1 Extracción y cuantificación de proteínas

Para la obtención de los lisados celulares, a las células en cultivo se les retira el medio, se lavan con PBS frío y se añade en la misma placa el tampón de lisis de proteínas compuesto por: 5 mM TrisHCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, inhibidores de proteasas (*cocktail de inhibidores, Complete Mini, Roche*) y de fosfatasas (ortovanadato sódico 100 mM y fluoruro sódico 1 mM). Se recogen los extractos celulares con ayuda de un rascador y se llevan a un Eppendorf. Posteriormente, se deja actuar el tampón de lisis durante 20 minutos a 4°C y posteriormente se centrifuga a 13000 rpm 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se conserva a -80 °C hasta su utilización.

Para la cuantificación se realiza una curva patrón con cantidades conocidas de BSA usando el método Bradford (*Bio-Rad DC Protein Assay*). Se mide la absorbancia de cada concentración conocida de BSA en un espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda para construir la curva patrón. La cantidad de proteína de la muestra se calcula extrapolando su absorbancia en la curva patrón.

5.8.2 Western Blot

En todos los casos se usa 25 µg de extracto de proteínas, mezclados con el tampón de carga (*XT simple buffer, Bio Rad*) y el tampón reductor (*XT reducing agent, Bio Rad*) para eliminar puentes disulfuro. La mezcla se calienta a 95°C durante 5 minutos, para desnaturalizar las proteínas. La electroforesis (SDS-PAGE) se realiza en geles de poliacrilamida 4-12% Bis-Tris (*Criterion XT Precast Gel, Bio Rad*).

La transferencia a membranas de nitrocelulosa (*Bio Rad*) se hace en sistema húmedo a 4°C durante 70 minutos a amplitud constante de 400 mA y el bloqueo en 5% de leche en TBST (Tampón TBS y 0,1% Tween 20) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incuban con el anticuerpo primario correspondiente: Akt (1:250, Cell Signaling Technology; 9272), pAkt (p-Ser473) (1:250, Cell Signaling Technology; 9271), EGFR (1:100, Epitomics; 1902-1), pEGFR (p-Tyr1068) (1:100 Epitomics, 1727-1), Erk (1:500, Santa Cruz Biotechnology; sc-93), pErk (p-Thr202/Tyr204) (1:250 Cell Signaling Technology; 9101), Stat3 (1:250, Cell Signaling Technology; 9132), pStat3 (p-Tyr705) (1:250, Cell Signaling Technology; 9131), p53 (1:500, cell Signaling Technology 2524) y Gapdh (1:5000, Sigma; G8795) en una solución al 5% de leche en TBS-T, a 4°C, un mínimo de 8 horas. Después de tres lavados en TBST de 10 minutos a temperatura ambiente se incuban las membranas con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidada (1:2000, Dako). La visualización de las proteínas se

realiza con el sistema ECL (GE Healthcare Amersham) usando distintos tiempos de exposición en función del anticuerpo.

5.8.3 Extracción de ARN total

El ARN procedente tanto de los explantes tumorales como de células acinares de ratón se extrae usando RNeasy^R TRIZOL (Invitrogen). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células. Quedando así dos fases (acuosa y orgánica). A partir de la fase acuosa se realiza la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol, respectivamente. Para ello, se elimina el medio de las placas de cultivo y se lavan con PBS frío. Inmediatamente añadimos 1 ml por placa de 10cm de diámetro del reactivo de trizol y con un rascador se recogen las células lisadas y se transfieren a un Eppendorf de 2 ml (en este paso se pueden congelar las muestras a -80°C o seguir con el procesamiento de las mismas). Posteriormente, se añade 200 µl de cloroformo frío, se agita vigorosamente durante 15 segundos y se mantiene a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación la muestra se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. En este paso se forman dos fases: la fase fenólica orgánica que contiene el ADN junto con los restos de proteínas desnaturalizadas y la fase superior acuosa que contiene el ARN. Esta última fase se transfiere a un tubo nuevo y se le añade isopropanol (500µl) para proceder a la precipitación del ARN: 1 hora a -20°C y posteriormente se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Tras eliminar el isopropanol por aspiración se realizan dos lavados con etanol al 70% y se centrifuga, 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Después del último lavado el precipitado de ARN se deja secar completamente para su posterior resuspensión en 25 µl de agua DEPC. Finalmente, se almacena a -80°C hasta el momento de realizar la síntesis de ADNc.

5.8.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADNc se sintetiza a partir del ARN total por medio de la transcripción reversa, utilizando hexámeros. Las moléculas de ARNm actúan como molde y los hexámeros actúan como cebadores. Es necesario la presencia de dNTP's que actúan como sustrato de la transcriptasa reversa. El producto es una hebra de ADN complementario. La RT-PCR se realiza en 3 fases:

Fase 1, desnaturalización de ARN: 1µg de RNA, 1 µl de hexámeros y 1µl de dNTP's (10mM), en un volumen de 12 µl, se calienta a 65°C durante 5 minutos y posteriormente se enfría en hielo para evitar la renaturalización.

Fase 2, hibridación: 5µl de la solución tampón y 2µl de DTT (0.1M) se mezclan vigorosamente y posteriormente se incuban durante dos minutos a temperatura ambiente.

5.- Material y Métodos

Fase 3, síntesis: se añade 1 µl (200 unidades) de la enzima transcriptasa reversa, se incuba a 25°C durante 10 minutos. Posteriormente se calienta la mezcla a 42°C durante 50 minutos. Para inactivar la enzima se calienta la mezcla a 70°C durante 15 minutos.

5.8.5 Reacciones de PCR a tiempo real (RT-PCT) con SYBR Green I

Una vez obtenido el ADNc las reacciones de PCR a tiempo real con SYBR Green I se llevaron a cabo utilizando los cebadores específicos (Tabla 5 y 6).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real “ABIPRISM 7700” (Applied Biosystems, Estados Unidos), utilizando la mezcla maestra “SYBR^(R) Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Estados Unidos). Esta mezcla incluye, en las cantidades adecuadas y listo para su uso, la enzima “AmpliTaq Gold^(R) ADN Polymerase”, dNTPs, MgCl₂ y el tampón de PCR e incorpora, como su nombre indica, el colorante SYBR Green I, que detecta ADN de doble hélice; por lo que no es necesario el uso de sondas específicas. Las muestras se amplificaron por triplicado en placas de 96 pocillos para reacciones ópticas (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Cada reacción se lleva a cabo en un volumen de 15 µl con los siguientes elementos: 7.5 µl de la mezcla maestra “SYBR^(R) Green PCR Master Mix”, 3.9 µl de agua Mili-Q, 0.9 µl de cada cebador (Tabla 5) a una concentración de 10 µM (siendo su concentración final 600 nM) y 1.8 µl de ADNc. Las condiciones térmicas de la amplificación son las siguientes: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C (activación enzimática), seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (desnaturalización y extensión).

Al final de cada reacción, se realiza un protocolo de disociación para asegurar la presencia del producto de PCR específico que se intenta amplificar. Las curvas de disociación son programadas de la siguiente manera: un ciclo de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C, 20 minutos de subida lenta de temperatura y otros 30 segundos a 95°C. Los datos para la curva de disociación fueron capturados durante la rampa de subida de temperatura y las curvas de disociación se visualizaron mediante el programa correspondiente del aparato ABI PRISM 7900.

5.- Material y Métodos

Nombre		Secuencia	AT(°C)	Tamaño(pb)
Amphiregulina	Forward	5'-CTGCTGGTCTTAGGCTCAGG-3'	55	145
	Reverse	5'-TTTCGCTTATGGTGGAAACC-3'		
Betacellulina	Forward	5'-GCACAGGTACCACCCCTAGA-3'	60	148
	Reverse	5'-GCCCCAAAGTAGCCTTTCTC-3'		
EGF	Forward	5'-GGGAAAATGTGTCTCCCTCA-3'	50	120
	Reverse	5'-TGTCCCATCATCGTCTGGTA-3'		
Epiregulina	Forward	5'-CGCTGCTTTGTCTAGGTTCC-3'	50	122
	Reverse	5'-GGGATCGTCTTCCATCTGAA-3'		
HB-EGF	Forward	5'-GACCCATGCCTCAGGAAATA-3'	50	128
	Reverse	5'-AGAGTCAGCCCATGACACCT-3'		
Neuregulina	Forward	5'-AGTGTGCGGAGAAGGAGAAA-3'	60	124
	Reverse	5'-TGGCAACGATCACCAGTAAA-3'		
TGF α	Forward	5'-ATCACCTGTGTGCTGATCCA-3'	60	129
	Reverse	5'-TGTCTCAGAGTGGCAGCAAG-3'		
mGAPDH	Forward	5'-CCCACTAACATCAAATGGGG-3'	60	275
	Reverse	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'		

Tabla 5: cebadores empleados en la PCR a tiempo real (RT-PCR) para calcular los niveles de expresión de los ligandos del Egfr. Se utiliza mGAPDH para la normalización.

pb: pares de bases

AT: temperatura de amplificación

Nombre		Secuencia	AT(°C)	Tamaño (pb)
HER-2	Forward	5'-GCTGCTGGACATTGATGAGA-3'	64	177
	Reverse	5'-GGGATCCCATCGTAAGGTTT-3'		
HER-3	Forward	5'-TCAAGATGTGTGAGCCTTGC-3'	63	224
	Reverse	5'-CTGCTGGTCTTAGGCTCAGG-3'		
HER-4	Forward	5'-TTCGCATTTTGAAGGAAACC-3'	64	129
	Reverse	5'-GCGAACTAGGTGTGGGTGAT-3'		
mGAPDH	Forward	5'-CCCACTAACATCAAATGGGG-3'	60	275
	Reverse	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'		

Tabla 6: cebadores empleados en la PCR a tiempo real (RT-PCR) para calcular los niveles de expresión de los otros receptores de la familia de *Egfr*. Se utiliza mGAPDH para la normalización.

pb: pares de bases

AT: temperatura de amplificación

5.9 Estadística

Los datos que se muestran son la media \pm desviación estándar (DE) de al menos dos explantes celulares del mismo genotipo de al menos tres experimentos diferentes. El número de ratones utilizado para cada protocolo está especificado en los apartados de resultados. Para el análisis de los datos obtenidos de los ensayos con ratones, las comparaciones de medias entre variables continuas se realizó utilizando el test U de Mann-Whitney en el caso de distribuciones no normales o t de Student para distribuciones normales.

Los valores de p(*) menores a 0.05 y p(**) menores a 0.01 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Para realizar los estudios de esta tesis se ha utilizado el modelo de ratón de cáncer de páncreas generado previamente en nuestro laboratorio: *ElasK-Ras^{G12V}* (41). Con este ratón genéticamente modificado se consigue la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* en un 30% de las células acinares desde estadios embrionarios (en ausencia de doxiciiclina) o en etapa adulta (administrando doxiciiclina hasta los dos meses de edad). Este modelo recapitula fielmente todos los estadios de la progresión tumoral humana, desde la iniciación en células acinares (metaplasia o transdiferenciación acino-ductal), al desarrollo de lesiones preneoplásicas de bajo (PanIN1) y de alto grado (PanIN2/3), hasta la formación de tumores (PDAC) y metástasis. Cuando el oncogén *K-Ras^{G12V}* se expresa desde etapas embrionarias se produce la transformación acino ductal sin necesidad de inflamación o de otros eventos genéticos añadidos. Sin embargo, las células acinares adultas presentan resistencia a la transformación por el oncogén *K-Ras* y se hacen necesarios otros factores, como la pancreatitis crónica (factor de riesgo muy importante para el desarrollo de cáncer de páncreas) para que en cooperación con *K-Ras^{G12V}* se desarrollen tumores pancreáticos (41).

6.1 Estudio de los fenómenos de senescencia

6.1.1 El fenómeno de senescencia aparece en las lesiones PanIN de bajo grado

Las primeras observaciones realizadas en ratones que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* desde estadios embrionarios mostraron que, las metaplasias y las lesiones PanIN de bajo grado expresan marcadores de senescencia similares a los que aparecen en los estadios preneoplásicos de otros tipos de tumores. La senescencia desaparece durante la progresión tumoral (23). Nuestros resultados confirmaron la presencia de los marcadores de senescencia: tinción de SABG (Senescencia Asociada a β -Galactosidasa) y expresión de p16/p19 en las lesiones de bajo grado y su ausencia en las lesiones de PanIN de alto grado (PanIN2/3), al igual que en los PDAC (Figura 10). Además, los marcadores de senescencia se correlacionan de manera inversa con la proliferación celular, evaluada por la expresión de KI67. Así, este marcador tiene una expresión <10% en las lesiones PanIN de bajo grado; en cambio, estas lesiones presentan un alto porcentaje de tinción de SABG y de p16. En las lesiones PanIN de alto grado (PanIN 2/3) y PDAC la expresión de KI67 es >50% y no hay expresión de marcadores de senescencia (Figura 10).

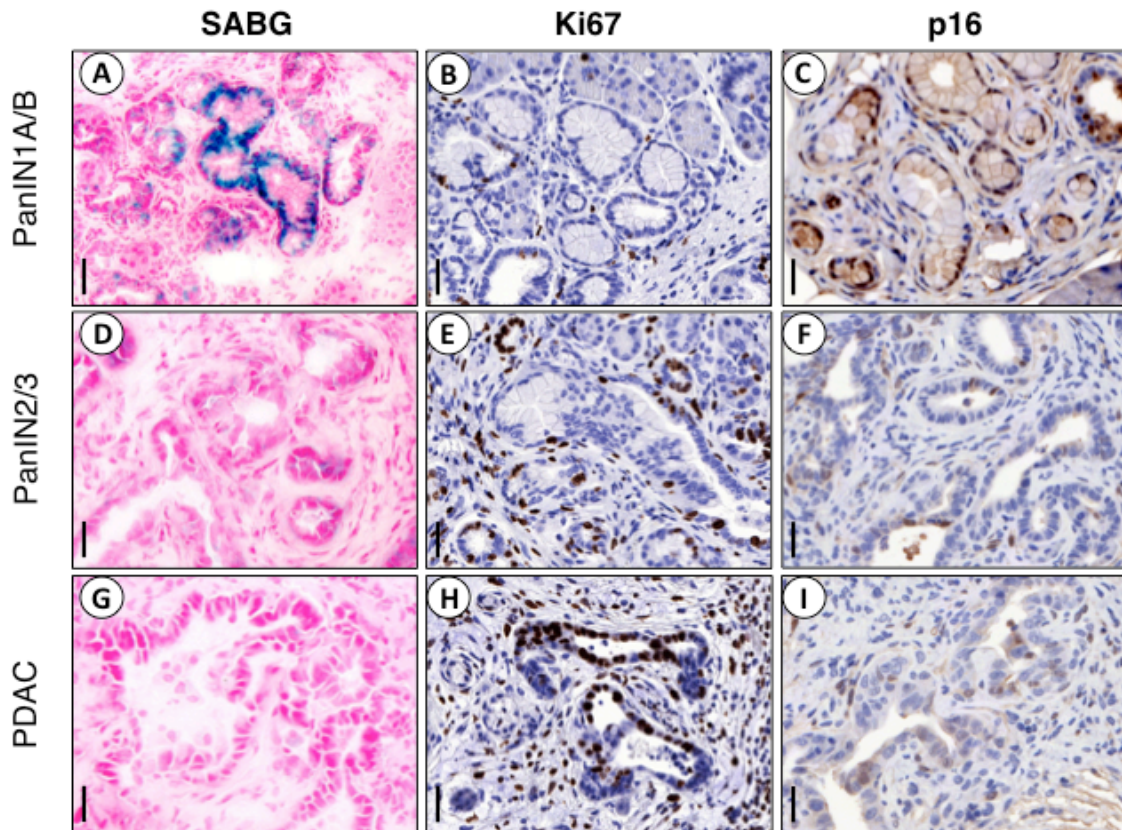


Figura 10: Los marcadores de senescencia se expresan en lesiones PanIN de bajo grado, pero desaparecen en las de alto grado y PDAC: A-C) Las lesiones PanIN de bajo grado son positivas para los marcadores de senescencia (SABG y p16), por el contrario son negativas para el marcador de proliferación celular KI67. D-F) Las lesiones PanIN de alto grado son negativas para los marcadores de senescencia p16 y SABG pero expresan el marcador de proliferación celular KI67 en un alto porcentaje G-I) Los tumores (PDAC) expresan en más de un 50% de sus células el marcador de proliferación celular KI67 y no los marcadores de senescencia SABG y p16. La barra de escala representa 50 μ m.

Sin embargo, la senescencia inducida por oncogenes (OIS) no es una consecuencia inmediata de la expresión de $K-Ras^{G12V}$ ya que, las células acinares que expresan el oncogén $K-Ras^{G12V}$, en el estadio embrionario o adulto no expresan los marcadores de senescencia (Figura 11). La expresión de este marcador se hace evidente en las primeras etapas de la progresión tumoral (metaplasias) y en las lesiones PanIN de bajo grado. Por lo tanto, para que tenga lugar la senescencia inducida por el oncogén $K-Ras^{G12V}$ es necesario que exista transformación celular.

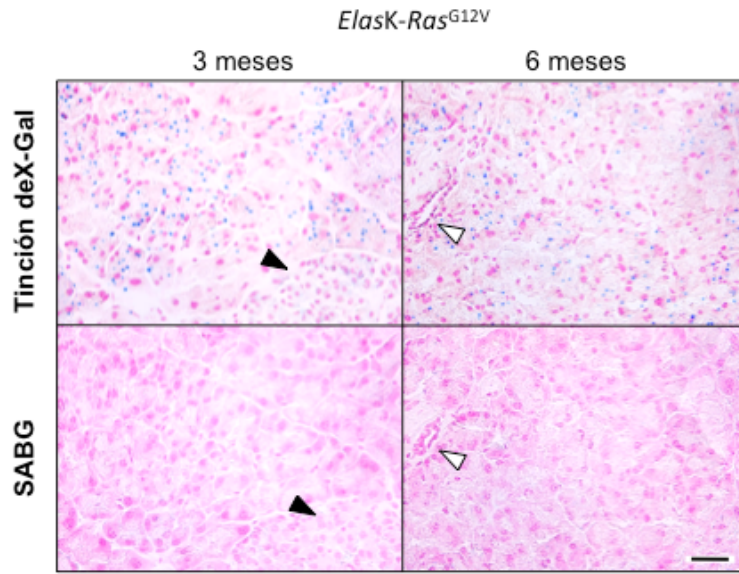


Figura 11: La expresión del oncogén $K-Ras^{G12V}$ en células acinares no es suficiente para inducir OIS. Los ratones fueron tratados con doxiciclina hasta los 2 meses. A partir de este momento se consigue la expresión de $K-Ras^{G12V}$ en células acinares. Panel superior: análisis de la actividad β -galactosidasa (punteado azul por la tinción de X-Gal) en páncreas de ratones $Elask-Ras^{G12V}$ de 3 y 6 meses de edad. Panel inferior: No se observa tinción de senescencia asociada a β -galactosidasa (SABG). El islote se indica por triángulos negros y los ductos por triángulos blancos. Barra de escala representa 50 μ m.

Puesto que p16 se expresa en las lesiones senescentes (PanIN de bajo grado) y su expresión se pierde durante la progresión tumoral, las lesiones PanIN de ratones $Elask-Ras^{G12V}$; $p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox}$ deberían ser negativas para otros marcadores de senescencia como SABG. La progresión tumoral en los ratones $Elask-Ras^{G12V}$; $p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox}$ no tratados con doxiciclina (expresan el oncogén $K-Ras^{G12V}$ y pierden la expresión de los supresores tumorales $p16/p19$ desde estadios embrionarios) es muy rápida. Las lesiones que aparecen son mayoritariamente PanIN de alto grado y las pocas lesiones de bajo grado que se encuentran no presentan marcadores de senescencia (Figura 12). Este resultado indica por tanto, que dichos supresores tumorales juegan un papel fundamental en la inducción de senescencia en lesiones PanIN de bajo grado.

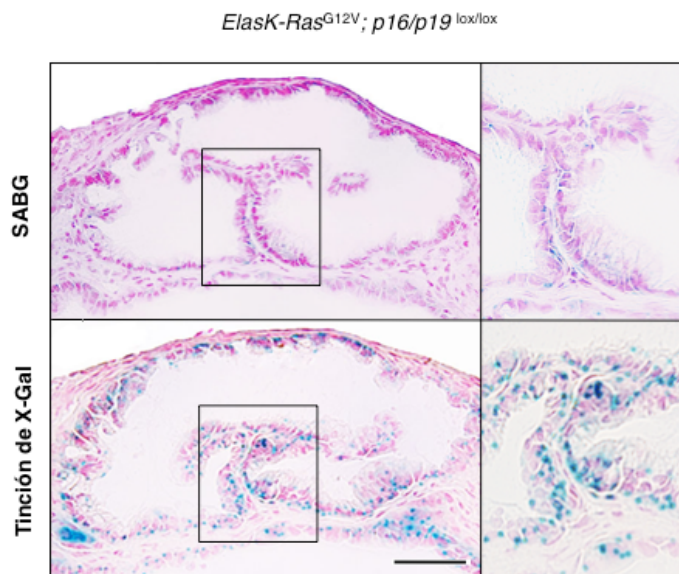


Figura 12: Las lesiones PanIN que pierden $p16/p19$ en el estadio embrionario no expresan marcadores de senescencia. Panel superior: Las lesiones PanIN de bajo grado de ratones $Elask-Ras^{G12V}$; $p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox}$ no tratados con doxiciclina, son negativas para SABG. Panel inferior: las mismas lesiones (cortes seriados) son positivas para la expresión de $K-Ras^{G12V}$, (tinción de X-Gal). El área amplificada se señala por cuadrados negros. Barra de escala representa 50 μ m.

6.2 Papel del supresor tumoral *p16Ink4a* y de la pancreatitis en el desarrollo tumoral

6.2.1 La pancreatitis contribuye al desarrollo de lesiones PanIN debido a la inhibición de la senescencia inducida por oncogenes

El cáncer de páncreas no es de tipo pediátrico por lo que los estudios con modelos de ratón deberían hacerse iniciando la expresión de oncogén *K-Ras*^{G12V} en estadios adultos. Nuestro modelo nos permite expresar el oncogén *K-Ras*^{G12V} en la etapa adulta de los ratones. Para ello mantenemos a los animales con doxiciclina hasta los dos meses de edad, momento en el que se los considera adultos. Al eliminar la doxiciclina del agua de bebida permitimos la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} en un porcentaje de células acinares del páncreas (20-30%). Cuando se analizaron los páncreas de estos ratones a diferentes puntos después del inicio de la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} se observó que, ninguno de los animales desarrolló lesiones (41); ni siquiera en ausencia de supresores tumorales como *p16Ink4a/p19Arf* o *p53* (39). Sin embargo, se vió que era necesario otra serie de factores de riesgo, como la pancreatitis para que cooperasen con el oncogén *K-Ras*^{G12V} en el desarrollo de tumores de páncreas (41).

Por tanto, mantuvimos a los animales bajo doxiciclina hasta los 2 meses de edad, momento en el que se expresa el oncogén *K-Ras*^{G12V}. Un mes más tarde, inyectamos diariamente y durante tres meses, ceruleína análogo de la colecistoquinina (enzima pancreática), para la generación de la pancreatitis crónica. A partir de ahora, a este procedimiento le llamaremos protocolo adulto. Todos los animales analizados en este protocolo desarrollan diferentes grado de lesiones preneoplásicas y alrededor de un 20% de ellos desarrolla PDAC un año después del inicio de la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}. Las lesiones desarrolladas por estos animales son más agresivas que las del protocolo prenatal y progresan con mayor rapidez (41).

Las lesiones de bajo grado, como se ha explicado en el apartado anterior (6.1.1) expresan diferentes marcadores de senescencia (SABG y p16). En cambio, la expresión de dichos marcadores se pierden durante la progresión tumoral. Nos planteamos estudiar si la senescencia es una característica propia de las lesiones de bajo grado del protocolo embrionario o si en el protocolo adulto puede ser inhibida por la pancreatitis, explicando así la rápida progresión de las lesiones.

Para contestar a estas preguntas comparamos la expresión del marcador de senescencia SABG en las lesiones PanIN de bajo grado en ambos protocolos (embrionario y adulto) en presencia de pancreatitis inducida tras el tratamiento con ceruleína. Los ratones *ElasK-Ras*^{G12V} que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} a partir del estadio embrionario fueron sometidos al tratamiento con ceruleína durante tres meses (desde los 3 meses hasta los 6 meses). Comparamos

6.- Resultados

las lesiones desarrolladas por estos animales con aquellas desarrolladas por ratones control, aquellos que desarrollaron lesiones sin la inducción de la pancreatitis. Las lesiones de bajo grado de estos ratones control, como se indicó en el apartado 6.1.1 expresaban marcadores típicos de senescencia como la tinción SABG y p16 (Figura 13A y 13C). En cambio, ninguna de las lesiones PanIN de bajo grado de ratones que estaban en tratamiento con ceruleína expresaban los marcadores de senescencia (Figura 13D y 13F). Este resultado explica la rápida progresión tumoral en el contexto de la pancreatitis.

En el protocolo adulto (la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} se produce a los 2 meses de edad) se trataron ratones *ElasK-Ras*^{G12V} durante tres meses con ceruleína. Las lesiones PanIN de los ratones sacrificados al terminar el tratamiento no expresan ningún marcador de senescencia (Figura 13G y 13I).

Puesto que la instauración de la senescencia podría ser un mecanismo de protección frente al desarrollo tumoral decidimos estudiar si la desaparición de la respuesta inflamatoria tendría algún efecto en la reaparición de la senescencia. Para ello, se sacrificaron ratones tres meses después de finalizar el tratamiento con ceruleína. Las lesiones PanIN de bajo grado de los ratones analizados tres meses después del tratamiento con ceruleína, es decir, una vez recuperado el páncreas de la inflamación, presentan expresión de los marcadores típicos de senescencia como p16 y tinción SABG (Figura 13J y 13L) como sucede en el protocolo embrionario. De hecho, la senescencia aparece incluso un mes después del cese del tratamiento con ceruleína, aunque en este momento, la respuesta inflamatoria no haya remitido por completo (datos no mostrados).

Todas estas observaciones indican que la senescencia inducida por el oncogén *K-Ras*^{G12V} en las lesiones PanIN de bajo grado se inhibe en presencia de pancreatitis. Lo más importante desde un punto de vista clínico es que se trata de un proceso reversible, es decir, la senescencia puede reaparecer una vez remitido el daño provocado por la pancreatitis.

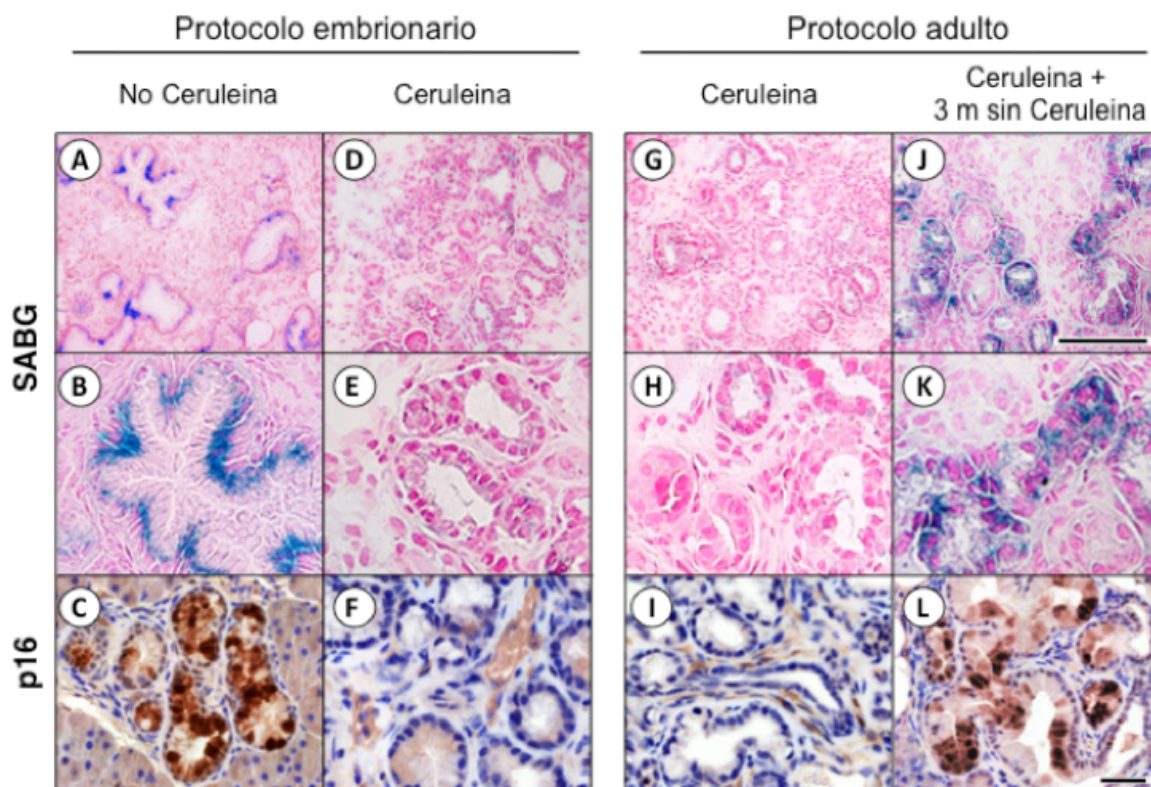


Figura 13: Los marcadores de senescencia reaparecen en las lesiones PanIN de bajo grado cuando el páncreas se ha recuperado parcialmente del daño producido por la pancreatitis. Los dos paneles de la izquierda muestran las lesiones PanIN de ratones *ElasK-Ras^{G12V}* que expresa el oncogén *K-Ras^{G12V}* desde estadios embrionarios (protocolo embrionario). **A-C)** Las lesiones PanIN de bajo grado (A y B) son positivas para la tinción SABG (color azul) y (C) para la expresión de p16 (color marrón). (B) Imagen ampliada de A, para observar con más detalle la tinción SABG en las lesiones PanIN. **D-F)** Lesiones PanIN de bajo grado de ratones tratados durante 3 meses con ceruleína (P60-P150). (D y E) Las lesiones son negativas para la tinción SABG y (F) negativas para la expresión de p16. (E) Imagen ampliada de D, para observar con más detalle las lesiones PanIN negativas para la tinción de SABG. Los dos paneles de la derecha muestran las lesiones PanIN de ratones *ElasK-Ras^{G12V}* en los que el oncogén *K-Ras^{G12V}* se expresa desde los 2 meses de edad, protocolo adulto. **G-I)** Lesiones PanIN de bajo grado de ratones *ElasK-Ras^{G12V}* tratados con ceruleína durante 3 meses (P90-P180). (G y H) No se detecta tinción de SABG y (I) son negativas para la expresión de p16. (H) Imagen ampliada de G. **J-L)** Lesiones PanIN de bajo grado de ratones *ElasK-Ras^{G12V}* tratados con ceruleína durante 3 meses (P90-P180) y analizados 3 meses después de terminar el tratamiento. (J y K) Las secciones son altamente positivas para SABG (color azul) y (L) para la expresión de p16 (color marrón). (K) Imagen ampliada de J, para observar con más detalle la tinción SABG en las lesiones PanIN. La barra de escala representa 50 μm en (A, D, G y J) y 20 μm en (B, C, E, F, H, I, K, y L).

6.2.2 El tratamiento con antiinflamatorios retrasa la aparición de lesiones provocadas por la pancreatitis y revierte el daño tisular

Para evaluar el papel de la inflamación en la progresión tumoral, se trataron los ratones *ElasK-Ras^{G12V}* con Sulindac. El Sulindac es un fármaco antiinflamatorio que inhibe a las enzimas COX1 y COX2 (146). Ambas isoenzimas catalizan la conversión del ácido araquidónico para la formación de prostaciclina y tromboxano A2. La isoenzima COX2 está presente en las zonas de

6.- Resultados

inflamación o en áreas expuestas a mediadores de la inflamación. En cambio, la isoenzima COX-1 está presente de manera constitutiva en todos los tejidos.

Se trataron animales *ElasK-Ras*^{G12V} del protocolo adulto, (doxiciclina hasta los 2 meses de edad y ceruleína desde los 3 hasta los 6 meses de edad) con Sulindac durante 3 meses. A un segundo grupo (control) no se realizó ningún tratamiento con Sulindac. Los animales se analizaron tres meses después del tratamiento con ceruleína en presencia o no de Sulindac. Los grupos no tratados con el fármaco antiinflamatorio presentaban las lesiones típicas de la pancreatitis, atrofia del parénquima, edema e infiltrado inflamatorio. Además, el páncreas mostraba todo el espectro de lesiones, desde lesiones PanIN de bajo grado hasta lesiones de alto grado y PDAC (Figura 14). En cambio, el grupo tratado con Sulindac conservaba intacto el parénquima pancreático, presentando sólo pequeñas áreas de atrofia y poco infiltrado inflamatorio (Figura 14). Además, se vió una considerable reducción de lesiones de alto grado (75%) y lo más importante, las pocas lesiones que aparecían eran mucho más pequeñas. Estos resultados refuerzan la idea del papel de la pancreatitis en el rápido desarrollo de lesiones PanIN y en la progresión tumoral.

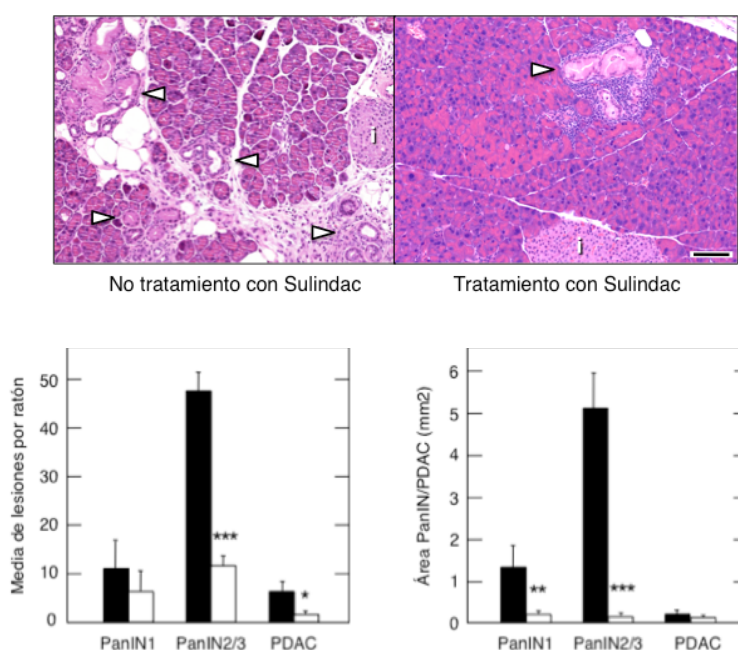


Figura 14: El tratamiento con Sulindac inhibe la respuesta inflamatoria, revirtiendo el daño tisular y retrasando la progresión tumoral. Panel superior H/E de ratones tratados o no con Sulindac. Los triángulos muestran las lesiones de cada ratón. La barra de escala representa 50 μm. En la parte inferior, el gráfico de la izquierda representa la media de las lesiones ± DE en animales no tratados (barras negras) (n=3) y animales tratados (barras blancas) (n=3) ***p < 0.00017, *p < 0.036. El gráfico de la derecha señala el área pancreática afectada por las lesiones ± DE en animales no tratados (barras negras) (n=3) y animales tratados (barras blancas) (n=3) **p<0.0037, ***p < 0.00012.

6.2.3 La inflamación inducida por la pancreatitis bloquea la senescencia en lesiones preneoplásicas (PanIN) de pacientes

Examinamos la presencia de P16, como marcador de senescencia, en biopsias de páncreas de 6 pacientes con cáncer pancreático. Las muestras analizadas presentaban PDAC y lesiones PanIN. Todos los PanIN de bajo grado analizados mostraban una fuerte señal nuclear de P16, mientras que ninguno de los tumores analizados presentaban niveles detectables del supresor tumoral (Figura 15). También se hicieron análisis paralelos con KI67, marcador de proliferación celular. Los resultados obtenidos se correlacionan de manera inversa con los de P16. Estos datos concuerdan perfectamente con los obtenidos con nuestro modelo de ratón (apartado 6.1.1). Por tanto, las lesiones PanIN de bajo grado presentes en los páncreas de pacientes presentan marcadores de senescencia como sucede en las lesiones PanIN del ratón.

Estudiamos también la presencia de marcadores de senescencia en las lesiones PanIN obtenidas de biopsias de pacientes afectados de pancreatitis crónica. Para nuestra sorpresa 4 de las muestras analizadas de un total de 9 que contenían lesiones de PanIN fueron positivas para P16 (Figura 15). Revisando el historial clínico de estos pacientes se vio que los 4 pacientes habían recibido tratamiento antiinflamatorio. Dos de ellos fueron tratados con prednisolona y los otros dos con antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Además, los pacientes que no presentaban expresión de P16 en lesiones preneoplásicas no habían recibido tratamiento antiinflamatorio (Figura 15). También se observaron diferencias en cuanto a la expresión de KI67 en pacientes que habían sido tratados o no con antiinflamatorios. Así, aquellos tratados con antiinflamatorios no presentaban expresión para el marcador de proliferación celular. En cambio, los pacientes que no habían sido tratados mostraban una fuerte expresión de KI67 (Figura 15). Estos resultados reproducen los obtenidos con el modelo de ratón. Además, sugieren que el tratamiento con fármacos antiinflamatorios podría tener un beneficio clínico en el paciente, debido a que inhibe la respuesta inflamatoria generada por la pancreatitis y ayuda a mantener la senescencia en las lesiones de bajo grado, impidiendo por tanto, su progresión.

Futuros estudios establecerán si los pacientes tratados con antiinflamatorios están protegidos frente al desarrollo tumoral.

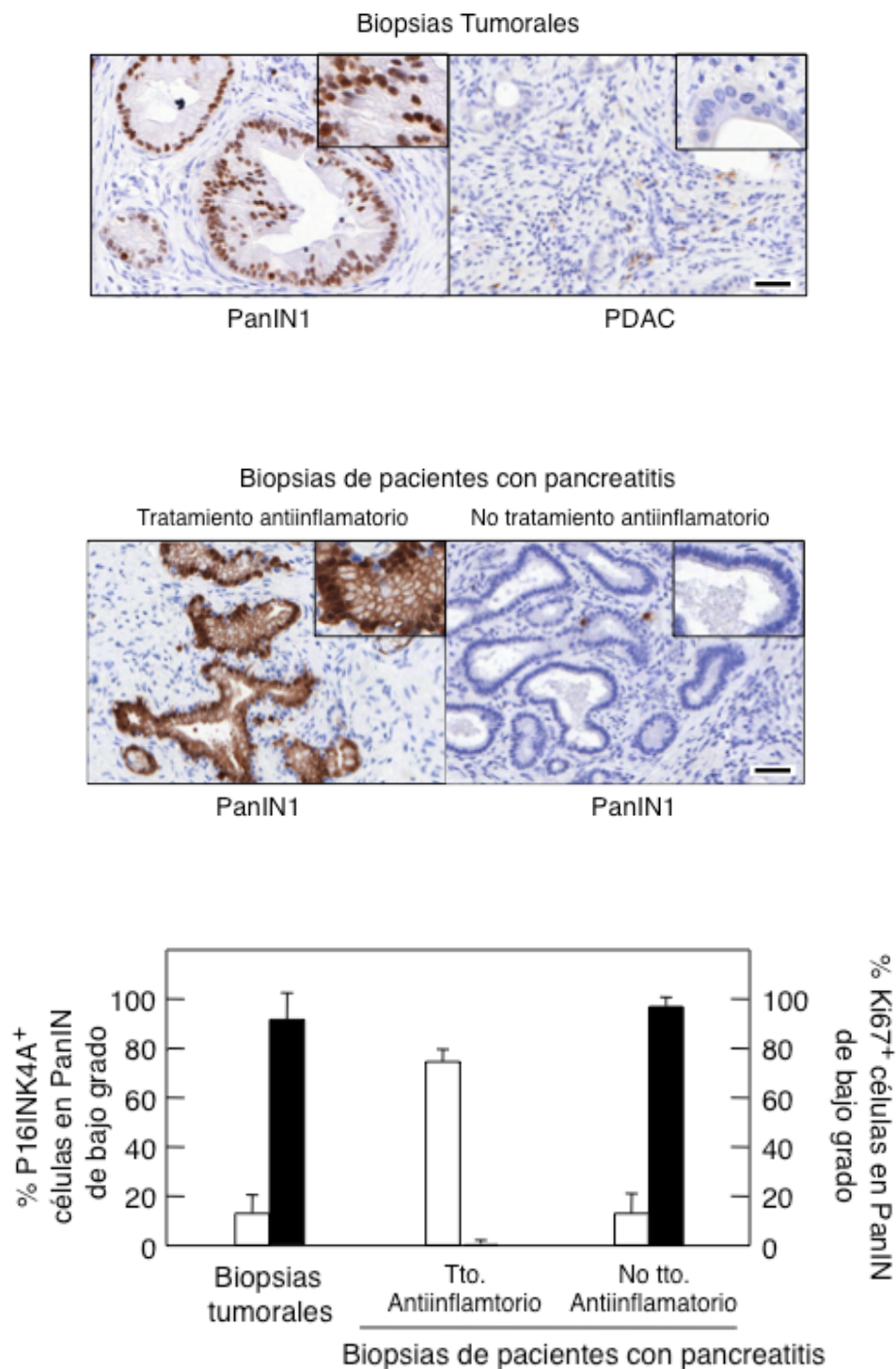


Figura 15: Expresión de marcadores de senescencia en lesiones preneoplásicas (PanIN) de bajo grado de biopsias humanas. El panel superior muestra la inmunohistoquímica de P16 positiva en las lesiones PanIN de bajo grado y negativa en PDAC. En el panel central se muestra la expresión de P16 por inmunohistoquímica en biopsias perteneciente a pacientes diagnosticados de pancreatitis. El marcador de supresión tumoral es positivo en las lesiones PanIN de los pacientes tratados y negativa en los pacientes no tratados con antiinflamatorios. La barra de escala representa 50 μ m. El gráfico inferior señala la cuantificación de células positivas tanto para P16 (barras blancas), como para Ki67 (barras negras) \pm DE de las biopsias humanas: tumorales y procedentes de pacientes con pancreatitis y dentro de este grupo aquellos tratados y no tratados con fármacos antiinflamatorios.

6.3 Papel de *Egfr* en la iniciación tumoral inducido por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} y su posible uso terapéutico

En 2005, un elegante estudio demostró el papel esencial de la señalización de EGFR, en el proceso de transdiferenciación acino ductal *in vitro*. El estudio se realizó en células acinares de páncreas procedente de ratones silvestres (97).

Por otro lado, en 2007 un estudio clínico que combinaba Gemcitabina (agente quimioterápico que se utiliza para tratar diferentes tipos de cáncer) con Erlotinib (inhibidor del grupo Tirosina Quinasa de EGFR) mostraba un efecto beneficioso para un número limitado de pacientes con PDAC (103). Hasta la actualidad, los resultados obtenidos con esta terapia no son tan concluyentes para que la FDA (Asociación de Alimentos y Fármacos) recomiende la combinación de estos dos fármacos como terapia de elección en el cáncer de páncreas.

Todas estas observaciones resultan curiosas, ya que EGFR es un señalizador vía Ras. Por lo que, su inhibición debería tener poco o ningún efecto cuando el oncogén *K-RAS*^{G12V} está activado (168). De hecho, esto sucede en otro tipo de tumores, como el de pulmón (NCSLC), en el que las mutaciones de *EGFR* y *K-RAS* son mutuamente excluyentes (142). Además, un importante estudio clínico llevado a cabo en pacientes que presentan avanzado estado tumoral de colon (CRC), reveló que aquellos que presentaban mutaciones en el oncogén *K-RAS* no se beneficiaban del tratamiento con Cetuximab (anticuerpo monoclonal que bloquea la señalización a través de EGFR) (72).

Teniendo en cuenta todo lo explicado anteriormente nos planteamos determinar *in vivo* si EGFR juega un papel esencial en la iniciación tumoral, y si coopera con el oncogén K-Ras en el desarrollo de tumores pancreáticos, de colon y pulmón y si EGFR se podría usar como diana terapéutica. Para responder a estas cuestiones empleamos los modelos de ratón genéticamente modificados generados previamente en nuestro laboratorio (40, 41) (39) y la combinación con el modelo knockout condicional de *Egfr* (107).

6.3.1 Expresión de EGFR en lesiones pancreáticas preneoplásicas (PanIN) y PDAC en muestras humanas y de ratón

Estudios previos han demostrado que la señalización a través de *Egfr* es imprescindible para que tenga lugar la transformación acino-ductal *in vitro* (97). Lo siguiente a investigar es si los resultados obtenidos *in vitro* correlacionan con los resultados *in vivo*. Para ello quisimos estudiar el patrón de expresión de *Egfr* en nuestro modelo de ratón *ElasK-Ras*^{G12V} y compararlo además, con el patrón de expresión de los pacientes que hayan desarrollado cáncer de páncreas.

6.- Resultados

En ratones, no se detecta expresión de Egfr en las células acinares independientemente de que expresen el oncogén $K-Ras^{G12V}$ o no (Figura 16). Sin embargo, en el protocolo embrionario, en el que el oncogén $K-Ras^{G12V}$ empieza a expresarse en estadios embrionarios E16.5 en las células acinares del páncreas, empezamos a detectar niveles de Egfr en las metaplasias, es decir, en las células acinares que comienzan a transdiferenciarse. La expresión se mantiene en las lesiones PanIN independientemente del grado (Figura 16A) y continúa a lo largo de la progresión tumoral, incluso en glándulas tumorales bien diferenciadas (Figura 16A). En tumores poco diferenciados la expresión de EGFR disminuye a nivel de membrana y aparece en el citoplasma (Figura 16B). Nuestros resultados en lesiones PanIN y PDAC corroboran lo descrito anteriormente (52).

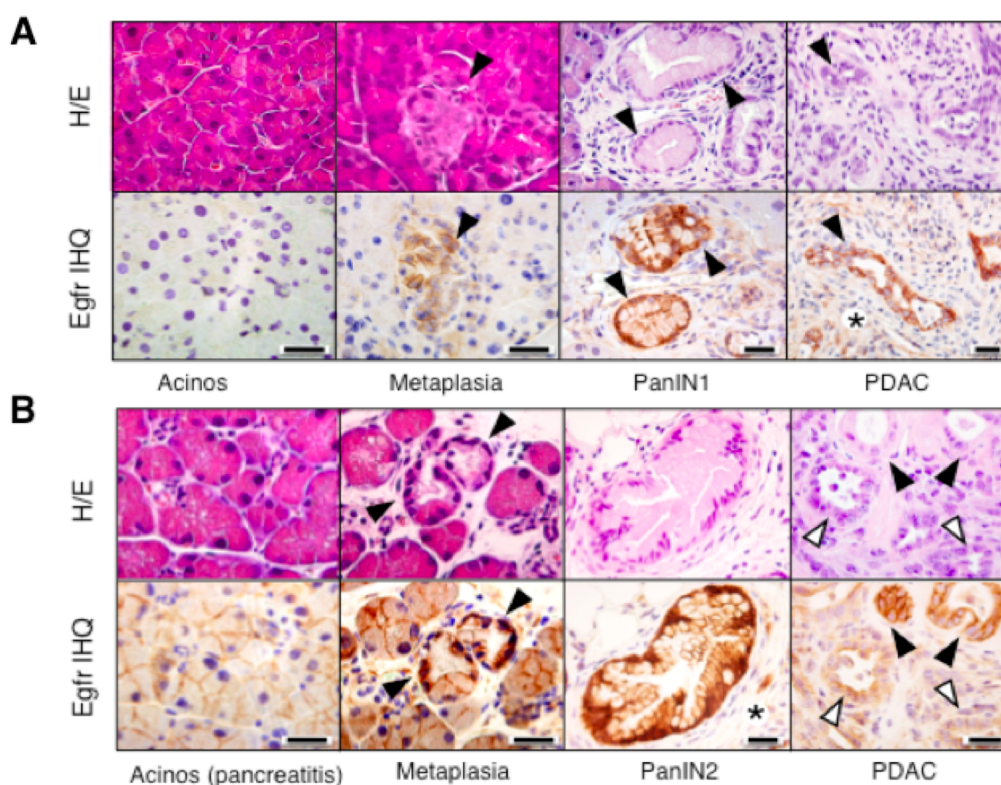


Figura 16: Expresión de Egfr en páncreas de ratones *ElasK-Ras^{G12V}* con y sin pancreatitis. A) Secciones de parafina seriadas del protocolo prenatal de ratones *ElasK-Ras^{G12V}*. **B)** Secciones de parafina seriadas de ratones *ElasK-Ras^{G12V}* procedentes del protocolo postnatal, tratados con ceruleína. Tinción de Hematoxilina-Eosina (H/E) e inmunohistoquímica de Egfr en acinos normales, PanIN y PDAC. Las lesiones se indicada con triángulos negros. * indica las células del estroma positivas para la tinción de EGFR. La barra de escala representa 20 μ m.

Tampoco se detectó la expresión de Egfr en las células acinares del páncreas de ratones pertenecientes al protocolo adulto (los animales se mantienen con doxiciclina hasta los dos meses de edad, momento en el que empieza la expresión de $K-Ras^{G12V}$ en las células acinares. En este protocolo para que los animales desarrollen lesiones es necesario la cooperación de la pancreatitis crónica (desde los tres hasta los seis meses de edad, se le inyecta diariamente ceruleína). En el contexto de la pancreatitis las células acinares expresan altos niveles de Egfr (Figura 16B) a nivel

6.- Resultados

de membrana. En las metaplasias, la expresión de Egfr aumenta y continua elevada durante la progresión tumoral en todos los grados de lesiones PanIN hasta los PDAC. Al igual que en el protocolo prenatal la expresión de membrana de Egfr se pierde en los tumores poco diferenciados detectándose en citoplasma (Figura 16B).

Los mismos resultados se obtuvieron en biopsias humanas: las células acinares no expresan niveles detectables de EGFR por inmunohistoquímica (Figura 17). Sin embargo, en muestras de pacientes con pancreatitis se puede observar expresión de EGFR en la membrana de los acinos, al igual que ocurre en ratones tratados con ceruleína (Figura 16). Estos datos concuerdan con los estudios en los que se describía la sobreexpresión de EGFR en pacientes que habían desarrollado pancreatitis crónica (76). Las metaplasias, las lesiones PanIN de bajo y alto grado y los PDAC de muestras humanas expresan también, altos niveles de EGFR (Figura 17). Los tumores bien diferenciados expresan niveles altos de EGFR. Por el contrario, aquellas glándulas menos diferenciadas expresan bajos niveles de EGFR en membrana y se detecta en citoplasma. Por último, las metástasis en linfonódulos de pacientes con PDAC humanos presentan expresión atenuada de EGFR en membrana y tinción en citoplasma (Figura 17). Estos resultados correlacionan perfectamente con los datos obtenidos en el modelo de ratón (Figura 16B). La expresión de Egfr se detecta al inicio de la transformación acino-ductal, en la metaplasia, y permanece alta durante los estadios de la progresión tumoral. Así mismo, la pancreatitis induce la expresión de Egfr en los acinos propiciando la aparición de metaplasias; lo que refuerza el papel de la pancreatitis como importante factor de riesgo en el desarrollo tumoral.

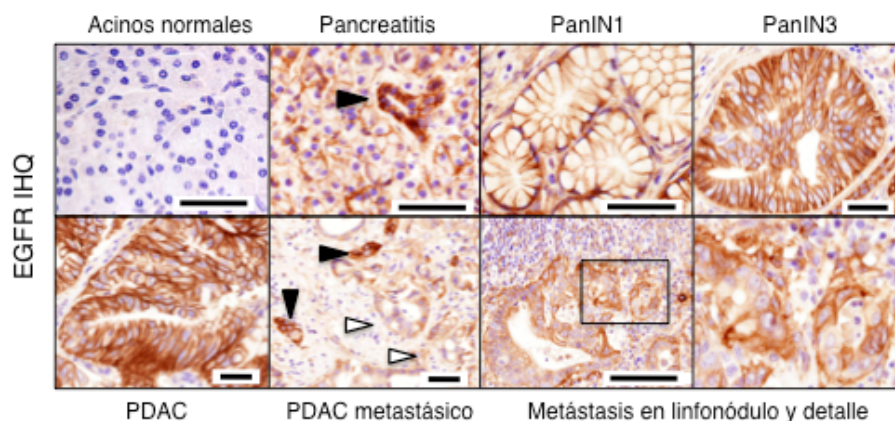


Figura 17: Expresión de EGFR en biopsias procedentes de pacientes con pancreatitis y PDAC. Inmunohistoquímica contra EGFR (EGFR-IHQ) en secciones de parafina de muestras procedentes de páncreas normal, pancreatitis, lesiones de PanIN (PanIN1 y PanIN3), PDAC y metástasis en linfonódulo. Las lesiones positivas para EGFR se indica con triángulos negros. Lesiones menos diferenciadas se indican con triángulos blancos. La barra de escala representa 50 µm.

6.3.2 La transdiferenciación acino-ductal en presencia del oncogén *K-Ras* requiere la señalización a través de EGFR

La transdiferenciación acino ductal (metaplasia) es el fenómeno por el que las células acinares se transforman en estructuras de tipo ductales, precursoras de las lesiones PanIN, proceso inducido por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} (118). En ratones la formación de metaplasias es dependiente de la señalización de Egfr (97). Como una de las rutas principales de señalización del receptor es a través de Ras, nos planteamos estudiar si en nuestro modelo la formación de metaplasias inducidas por el oncogén *K-Ras*^{G12V} es dependiente de *Egfr*.

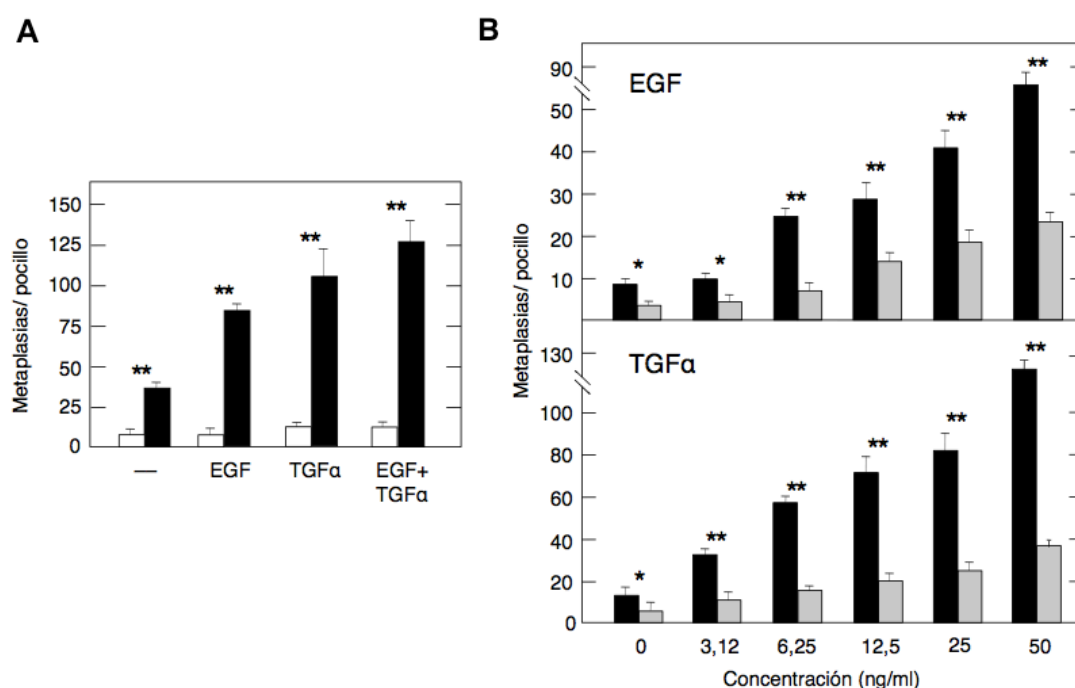


Figura 18: Cuantificación del número de estructuras de tipo ductal formadas in vitro a partir de células acinares.

A) Cuantificación en el día 5 de cultivo del número de metaplasias o estructuras de tipo ductal formadas *in vitro* tras el cultivo de células acinares de ratones de 7 semanas de edad, en ausencia de doxiciplina: *Elask-Ras*^{+/+} (barras blancas) y *Elask-Ras*^{G12V} (barras negras). Éste expresa el oncogén *K-Ras*^{G12V} desde estadios embrionarios (E16.5). Las células acinares fueron estimuladas con ligandos de Egfr: EGF, TGFα o una combinación de ambos, a una concentración de 50 ng/μl. **B)** Cuantificación de las estructuras de tipo ductal obtenidas tras la adición de concentraciones crecientes de EGF (panel superior) o TGFα (panel inferior) en ratones de 7 semanas de edad: *Elask-Ras*^{G12V};EGFR^{+/+} (barras negras) y ratones *Elask-Ras*^{G12V};Egfr^{lox/lox} (barras grises). El conteo se realizó el día 5 de cultivo. Se utilizaron 3 ratones por cada genotipo y cada condición por triplicado. Los datos representan la media ± DE. **p<0,01 y *p<0,05.

A partir de ratones *Elask-Ras*^{+/+} y *Elask-Ras*^{G12V} de 7 semanas de edad, se produce el aislamiento de células acinares para su posterior cultivo. A estos explantes acinares se les añadió dos ligandos de Egfr (EGF y TGFα a una concentración de 50 ng/μl) solo o en combinación. En el día 5 de cultivo, después de contar la estructuras de tipo ductal se vió que el proceso de transdiferenciación era de 5 a 10 veces más eficiente en ratones *Elask-Ras*^{G12V} que en aquellos que presentan los alelos salvajes del oncogén. Además, es independiente de la adición de los ligandos de Egfr. En estos cultivos no realizamos selección de las células acinares que expresan el

oncogén *K-Ras*^{G12V} con Genetecina, pero hay que tener en cuenta que sólo el 30% de las células acinares expresan dicho oncogén (Figura 18A).

La formación de metaplasias en cultivo en ratones *ElasK-Ras*^{G12V} es dependiente de la activación de la señalización de Egfr ya que, concentraciones crecientes de los ligandos EGF y TGF α aumentan la formación de estructuras de tipo ductal (Figura 18B). La ausencia de Egfr en las células acinares, reduce de manera importante, pero no por completo, la transdiferenciación acino-ductal (Figura 18B). Lo que sugiere que los ligandos añadidos al medio de cultivo pueden estar activando a otros receptores de la familia ErbB. De hecho, en células acinares procedentes de ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{lox/lox} hay un aumento en la expresión de los otros tres receptores (Her-2, Her-3, Her-4) comparado con ratones que presentan los alelos salvajes de *Egfr* (Figura 19A). Lo que explicaría que los otros receptores traten de compensar la ausencia de *Egfr* aumentando su expresión para mantener la señalización a través de esta ruta.

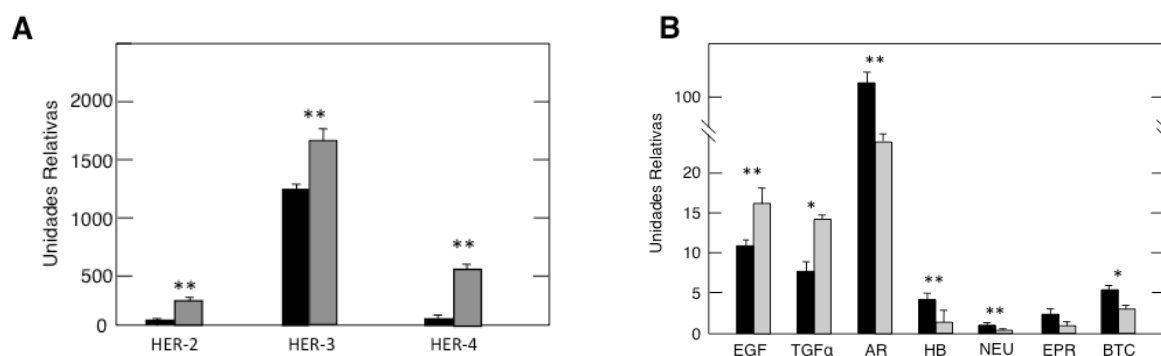


Figura 19: Cuantificación de la expresión de los otros receptores y ligandos de la familia ErbB. A) Cuantificación de los niveles de expresión por q-PCR de Her-2, Her-3, Her-4 en unidades relativas en células acinares. **B)** Cuantificación (en unidades relativas) de los niveles de expresión de los 7 ligandos de Egfr: EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), TGF α (Factor de Crecimiento Transformante), AR (Amphirregulina), HB-EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico de Unión a la Heparina), NEU (Neuregulina), EPR (Epirregulina), BTC (Betacelulina). *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{+/+} (barras negras) y *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{lox/lox} (barras grises). En ambos casos se utilizaron ratones de 7 semanas de edad donde el oncogén *K-Ras*^{G12V} se expresa desde estadios embrionarios (E16.5). Se utilizaron 3 ratones por cada genotipo y cada condición por triplicado. Los datos representan la media \pm DE. **p<0,01 *p<0,05.

Después del aislamiento de las células acinares, se analizó de forma cuantitativa la expresión de los ligandos de Egfr en los explantes acinares procedentes de ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{lox/lox} y *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{+/+}. Cabe destacar que en el ratón *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{lox/lox} existe un incremento en los ligando EGF y TGF α y una disminución importante de Amphirregulina respecto de los acinos que expresan *Egfr*. Junto con los datos anteriores no sabemos si estos ligandos son los responsables de la formación de metaplasias o son mecanismos de compensación de la ausencia de Egfr. Las estructuras de tipo ductal analizadas en ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{+/+} expresaban Egfr y marcadores de tipo ductal como la citoqueratina 19 (Figura 20).

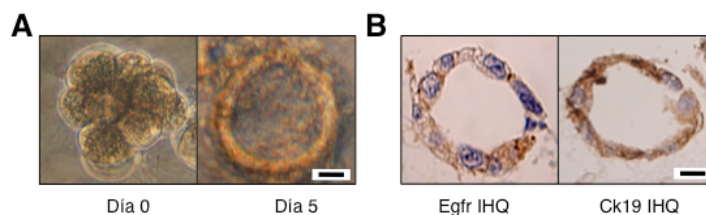


Figura 20: Fotografía de células acinares y estructuras de tipo ductal. A) Explantes acinares del día 0 de cultivo y estructuras de tipo ductal el día 5 de cultivo. B) Inmunohistoquímica en las estructuras de tipo ductal de Egfr (Egfr IHQ) y Citoqueratina 19 (Ck19 IHQ) En ambos casos son ratones *ElasK-Ras^{G12V};EGFR^{+/+}*. La barra de escala representa 10 µm.

6.3.3 La señalización de Egfr es esencial para la transdiferenciación acino-ductal *in vitro* en ausencia p16/p19 pero no en ausencia de p53

Como se ha explicado en el apartado anterior la señalización a través de Egfr es esencial para el proceso de transdiferenciación acino-ductal en presencia del oncogén K-Ras^{G12V}. Además, sabemos que las lesiones preneoplásicas de bajo grado expresan el marcador de senescencia p16 y que en ausencia de este supresor tumoral las lesiones progresan de manera más rápida y pierden la expresión de otros marcadores de senescencia. Teniendo en cuenta estos datos nos preguntamos si para el desarrollo de metaplasias *in vitro* la señalización a través de Egfr es imprescindible en ausencia de supresores tumorales como p16/p19. Para ello generamos la línea de ratón: *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox}* en presencia y en ausencia de *Egfr*. Se procedió al aislamiento y posterior cultivo de células acinares de ratones *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{+/+}* y *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* pertenecientes al protocolo embrionario. A estos explantes acinares se les añadió dos de los ligandos de Egfr (EGF y TGFα a una concentración de 50ng/µl) solos o en combinación.

Los explantes acinares procedentes de ratones *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{+/+}* se transdiferencian con una eficiencia 4 veces superior comparado con aquellos en los que se ha deletado *Egfr* (Figura 21). Además, estas metaplasias *in vitro* expresan marcadores de tipo ductal (dato no mostrado).

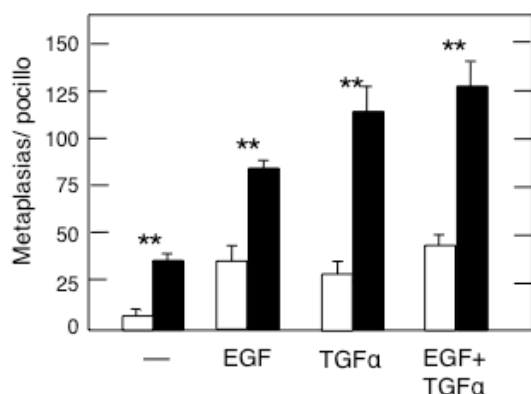


Figura 21: Cuantificación del número de metaplasias formadas en ausencia de p16/p19. Las células acinares procedentes de ratones *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (barras negras) se transdiferencian con una eficiencia 4 veces mayor que las procedentes de ratones *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (barras blancas). Sin añadir factores de crecimiento, en presencia de EGF, de TGFα o en combinación de ambos. El oncogén K-Ras^{G12V} se expresa a partir de E16.5. El conteo se realizó el día 5 de cultivo. Se utilizaron 3 ratones por genotipo y condición por triplicado. Los datos representan la media ± DE. **p<0,01.

Otro de los supresores tumorales que se encuentra inactivado en la mayoría de los PDAC es p53 (58). Nos preguntamos si en ausencia de p53 la señalización de Egfr es imprescindible para que tenga lugar la transdiferenciación acino-ductal. Para ello cruzamos nuestro modelo con el knockout condicional de p53 generando así la línea de ratón *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* en presencia y en ausencia de *Egfr*. Se procedió al aislamiento y posterior cultivo de células acinares de estos ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* de 7 semanas de edad. A los 5 días de cultivo, en ausencia de p53 y en presencia del oncogén *K-Ras^{G12V}* los explantes acinares se transdiferencian con una eficiencia 2 veces mayor que aquellos explantes procedentes de ratones que presentan los alelos salvajes de p53 (Figura 22). La ausencia de *Egfr* no impide la formación de metaplasias. Por tanto, en presencia de *K-Ras^{G12V}* y ausencia p53, *Egfr* no es esencial para la transdiferenciación acino-ductal *in vitro* (Figura 22). Al ser un modelo tan agresivo, produce una aceleración de la progresión tumoral, realizamos un recuento de las estructuras ductales formadas a día 3 del cultivo. En ausencia de factores de crecimiento, no hay transdiferenciación cuando se expresa el oncogén *K-Ras^{G12V}* en ausencia de *Egfr* en las células acinares del páncreas a este tiempo. En estas condiciones y tras la adición de los ligandos de Egfr, los explantes acinares procedentes de ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/+}* se transdiferencian con una eficiencia 3 veces mayor que aquellos explantes procedentes de ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* con los alelos salvajes de p53. Sin embargo, las células acinares pueden transformarse a estructuras de tipo ductal en ausencia de p53 y en presencia o no de *Egfr*; aunque la eficiencia de transformación es mayor en presencia de Egfr (Figura 22).

Por tanto, podemos concluir que la señalización a través de Egfr es necesaria en ausencia de supresores tumorales como p16/p19 (Figura 21) pero se hace parcialmente independiente de dicho receptor en ausencia de p53 (Figura 22).

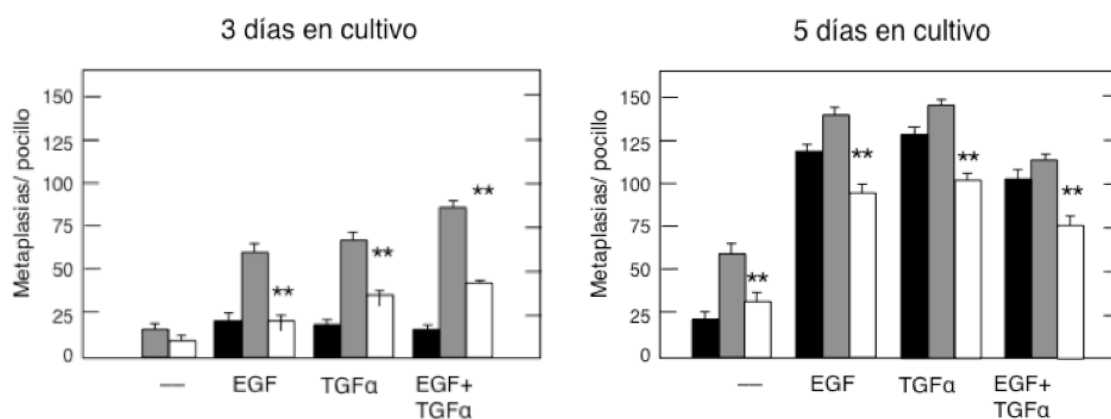


Figura 22: Cuantificación del número de metaplasias formadas en ratones en ausencia de p53. Cuantificación de metaplasias procedentes de ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{+/+};Egfr^{+/+}* (barras negras) *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (barras grises) y *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (barras blancas). Los explantes acinares se incubaron con suero sin añadir factores de crecimiento y también se añadió EGF, TGFα y la mezcla de ambos a una concentración de 50 ng/μl. El oncogén *K-Ras^{G12V}* se expresa desde estadios embrionarios (E16.5). El conteo se realizó los días 3 y 5 de cultivo. Se utilizaron 3 ratones por genotipo y condición por triplicado. Los datos representan la media ± DE. **p<0,01 de los ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* respecto de *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/+}*.

6.3.4 Egfr es esencial para el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC inducidas por la expresión del oncogén K-Ras

Nuestros resultados indican que la expresión de Egfr se inicia en metaplasias y se mantiene en las lesiones PanIN y en los PDAC (Resultados 6.3.1). Además, hemos visto que Egfr es necesario para la transdiferenciación acino-ductal, como indica nuestros resultados *in vitro* (Resultados 6.3.2). Por tanto, nos planteamos estudiar si *Egfr* era necesario en la iniciación tumoral *in vivo*. Para ello se usó la línea de ratón: *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}*. En este modelo, en ausencia de doxiciclina, la expresión de *K-Ras^{G12V}* y la delección de *Egfr* se produce a la vez, desde estadios embrionarios (E16.5), protocolo embrionario.

Se puede ver en secciones de OCT de los páncreas la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* por la tinción de X-Gal. Esta tinción da lugar a un punteado azul en un 30 % aproximadamente de las células acinares en las que se expresa el oncogén *K-Ras^{G12V}* (Figura 23A). No se observa diferencias entre los páncreas que expresan Egfr de los que lo tienen delecionado (dato no mostrado). Para comprobar la delección de Egfr se procedió a la microdissección por láser de las células que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* (mediante la tinción de X-gal). Después del aislamiento de ADN genómico y mediante PCR detectamos la delección de Egfr en las células acinares azules, es decir, aquellas que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* (Figura 23B).

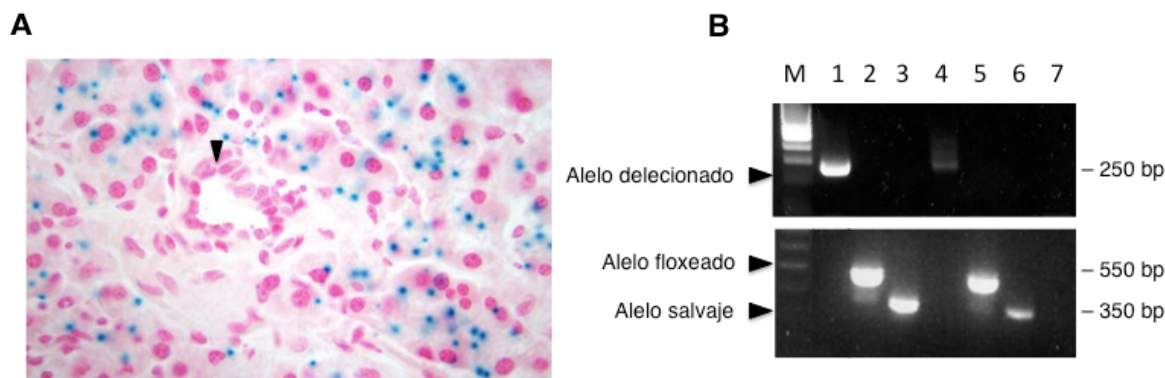


Figura 23: Análisis de la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* y de los alelos delecionados, floxeados y salvajes de *Egfr* en células acinares. A) Tinción de X-Gal en secciones de OCT de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}*. El punteado azul muestra la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* en células acinares, los ductos son negativos para la tinción (triángulo negro). B) Análisis de ADN por PCR de los alelos de *Egfr*: **Línea 1: control *RERTK-Ras^{G12V};Egfr^{-/-}* MEFs. **Línea 2:** control *RERTK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* MEFs. **Línea 3:** control *RERTK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}* MEFs. **Línea 4:** Células acinares positivas para la tinción de X-Gal procedente de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}*. **Línea 5:** Células acinares negativas para la tinción de X-Gal procedente de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}*. **Línea 6:** Células acinares positivas para la tinción de X-Gal procedente de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}*. **Línea 7:** control negativo, no ADN. **Línea M,** marcador.**

El 92% de los ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}* analizados (n=13) al año de edad, presentan abundantes lesiones PanIN de bajo y alto grado; concretamente una media de 16 y 5 lesiones por páncreas, respectivamente. Además, 3 de estos ratones (23%) presentaban tumores de tamaño

6.- Resultados

considerable (Figura 24). Animales heterocigotos ($n=10$) para el locus de *Egfr* también presentaban lesiones de bajo y alto grado aunque en menor número que los controles, una media de 5 y 2,5 lesiones por páncreas, respectivamente. Sólo 1 ratón heterocigotos presentaba PDAC (Figura 24). Por el contrario, el análisis de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* de un año de edad ($n=24$) solo reveló la presencia de un número limitado de lesiones de PanIN (10 de bajo grado y 3 de alto grado) en 8 ratones. (Figura 24).

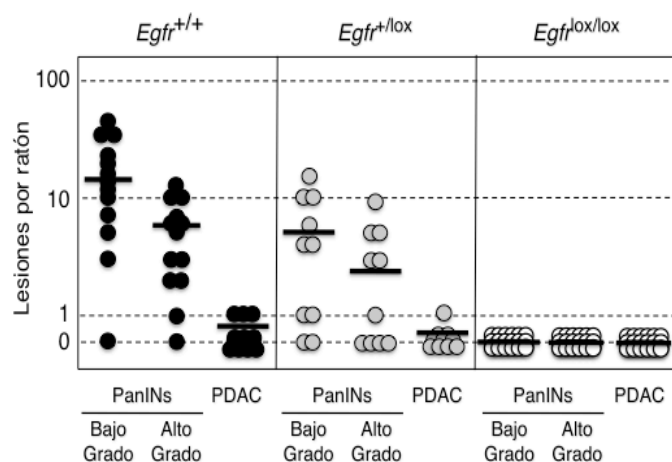


Figura 24: La formación de lesiones PanIN y PDAC inducidos por la expresión de *K-Ras^{G12V}* desde el estadio embrionario requiere de *Egfr*. Número de lesiones PanIN de bajo y alto grado y PDAC de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}* (círculos negros), *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/lox}* (círculos grises) y *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* (círculos blancos) analizados a un año de edad. La expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* y la delección de *Egfr* se produce desde estadios embrionarios (E16.5). Las barras horizontales indican la media del número de lesiones por ratón y por cada genotipo.

El análisis de estos ratones por inmunohistoquímica (Figura 25A) y por PCR (Figura 25B) reveló que estas lesiones retenían la expresión de *Egfr* debido a la incompleta recombinación de los alelos floxeados de *Egfr*. Por lo tanto, en ausencia de *Egfr* no se desarrollan lesiones PanIN (Figura 25). Resultados similares se obtuvieron cuando se analizaron los ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* con dos años de edad ($n=7$). Nuestros resultados *in vivo* demuestran que la señalización de *Egfr* es esencial para la formación de lesiones PanIN y PDAC inducidos por el oncogén *K-Ras^{G12V}*.

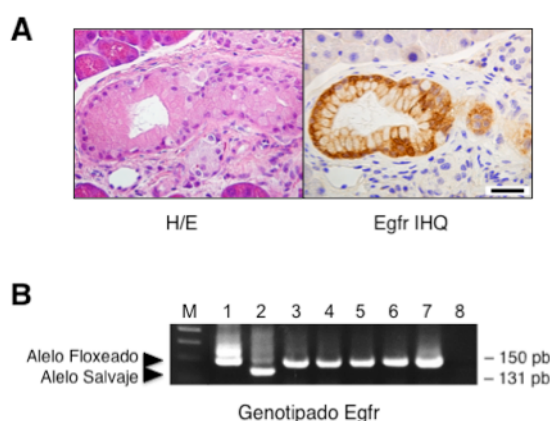


Figura 25: Expresión de EGFR por inmunohistoquímica y detección de los alelos floxeados de *Egfr* en lesiones PanIN de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* de un año de edad. A) Hematoxilina-eosina (H/E) e inmunohistoquímica de *Egfr* (Egfr IHQ) en lesiones PanIN de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}*. La barra de escala representa 25µm. B) Análisis de *Egfr* mediante PCR del ADN procedente de: Línea 1: control *RERTK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* MEFs. Línea 2: control *RERTK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* MEFs. Líneas 3-7: lesiones PanIN presentes en ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}*, no expuestos a doxiciclina. Línea 8: control negativo, no ADN. Línea M: marcador.

6.3.5 Egfr también es esencial para el desarrollo de tumores, en el protocolo adulto

Para excluir la posibilidad de que esos resultados se deban a defectos durante el desarrollo, los ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* y *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}* se trataron con doxiciclina (para evitar la expresión de la enzima Cre recombinasa) desde la concepción hasta la edad adulta (2 meses de edad). Como se ha descrito previamente, para la inducción de lesiones PanIN en estos ratones es necesario la cooperación de la pancreatitis. Los ratones fueron tratados diariamente con ceruleína desde los 3 hasta los 6 meses de vida (41). El análisis de los ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* (n=14) a los 14 meses de edad, es decir, un año después del inicio de la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* y de la delección de *Egfr*, reveló la ausencia de lesiones en estos ratones. Sólo en 3 ratones se observaron lesiones PanIN, las cuales expresaban *Egfr* (analizado por inmunohistoquímica y PCR). Los ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* examinados a 2 años de edad (n=7) presentaban 9 lesiones PanIN de bajo grado y 3 de alto grado. Todas las lesiones observadas en los ratones estudiados en los diferentes tiempos fueron analizadas y se comprobó que expresaban *Egfr* (dato no mostrado). Por lo que, en ausencia de *Egfr*, en el protocolo adulto, tampoco se desarrollan lesiones PanIN ni PDAC,

Los ratones control *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}* presentaban lesiones preneoplásicas de diferentes grados y algunos desarrollaron PDAC (39). Todos los ratones (n=13) desarrollaron lesiones de bajo grado; una media de 18 lesiones por páncreas y más del 90% (12 de 13 ratones) presentaban lesiones de alto grado; una media de 16 lesiones por páncreas. Sólo 1 ratón de los 13 analizados (8%) desarrolló un PDAC (Figura 26). Resultados similares se obtuvieron en animales heterocigotos de *Egfr* (80% presentaron lesiones PanIN y un 10% desarrolló PDAC). Sin embargo, la media de las lesiones por páncreas era significativamente menor comparado con los controles (Figura 26).

Los resultados obtenidos anteriormente y explicados en el apartado 6.3.4 y 6.3.5 corroboran que, para la iniciación de los adenocarcinomas pancreáticos es necesario al menos, dos vías de señalización independientes mediadas por *Egfr* y *K-Ras*.

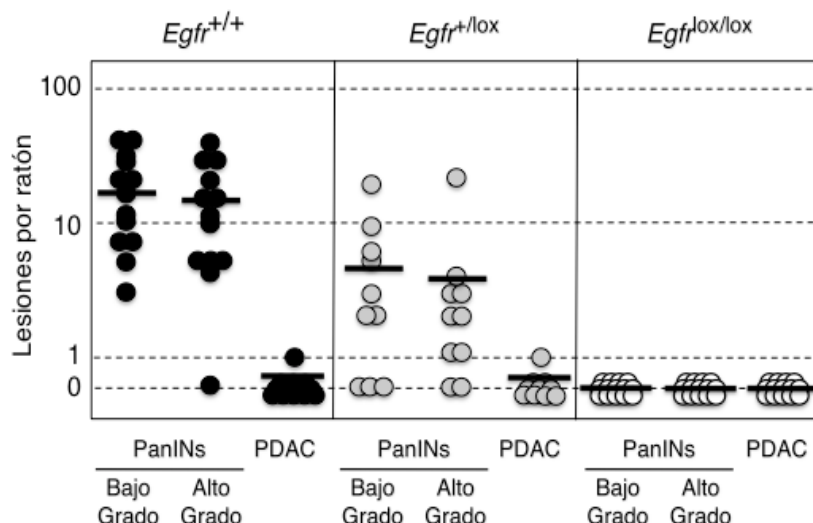


Figura 26: La formación de lesiones PanIN y PDAC inducidos por $K-Ras^{G12V}$ desde estadio adulto requiere la expresión de $Egfr$. A) Número de lesiones PanIN de bajo y alto grado y PDAC en ratones $ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}$ (círculos negros), $ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/lox}$ (círculos grises) y $ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}$ (círculos blancos) de 14 meses de edad. Los ratones fueron tratados con doxiciclina hasta los 2 meses de edad (momento en el que se produce la expresión del oncogén $K-Ras^{G12V}$ y escisión de $Egfr$) y con ceruleína desde los 3 hasta los 6 meses de edad. Las barras horizontales indican la media del número de lesiones por ratón y genotipo.

6.3.6 $Egfr$ coopera con el oncogén $K-Ras$ activando la vía de señalización de Akt y Stat3

Para averiguar el mecanismo por el cual $Egfr$ coopera con $K-Ras^{G12V}$ para inducir lesiones pancreáticas, examinamos, por inmunohistoquímica los niveles de dos de los efectores de $Egfr$: Akt (conocido efector de la ruta de señalización de $PI3k/Akt$) y Stat3 (mediador de citoquinas en inflamación que recientemente se ha descrito su implicación en el desarrollo de PDAC). (26) (32) (81). Las células acinares del páncreas de ratones $ElasK-Ras^{G12V}$ del protocolo embrionario no expresan niveles detectables de $Egfr$, ni fosforilación de Akt ni de Stat3. Esto indica que, al menos en este contexto celular, la oncoproteína $K-Ras^{G12V}$ no activa estas rutas de señalización (Figura 27). Por el contrario, los páncreas de ratones $ElasK-Ras^{G12V}$ del protocolo adulto tratados con ceruleína durante tres meses presentan una expresión uniforme en la membrana de EGFR y expresión nuclear de las proteínas fosforiladas Stat3 y Akt (Figura 27). Hay que recordar que la expresión de $K-Ras^{G12V}$ en este modelo se produce en un 30% de las células acinares, y por tanto la activación de la ruta $Egfr/Akt/Stat3$ debe ser independiente de la señalización de $K-Ras$ (39).

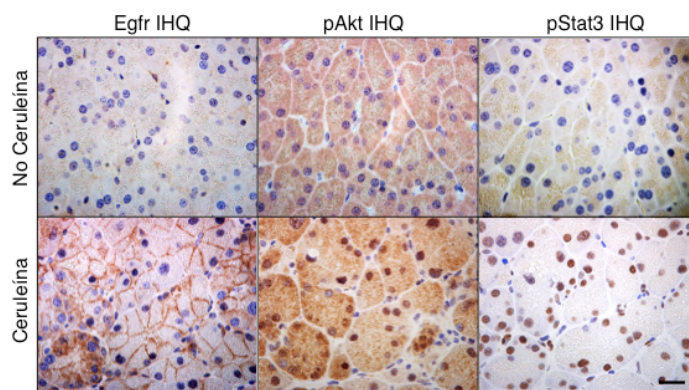


Figura 27: Expresión de Egfr y las proteínas fosforiladas Akt y Stat3 en ratones no tratados y tratados con ceruleína. Panel superior, inmunohistoquímica de Egfr en ratones *ElasK-Ras*^{G12V} de un año de edad pertenecientes al protocolo embrionario sin tratar con ceruleína (Egfr IHQ), Akt fosforilado (pAkt IHQ) y Stat3 fosforilado (pStat3 IHQ) en secciones seriadas de parafina. Panel inferior, inmunohistoquímica en ratones *ElasK-Ras*^{G12V} pertenecientes al protocolo adulto tratados con ceruleína desde los 3 hasta los 6 meses de edad, de Egfr (Egfr IHQ), de Akt fosforilado (pAkt IHQ) y de Stat3 fosforilado (pStat3 IHQ). La barra de escala representa 20 µm.

Las lesiones pancreáticas, incluyendo metaplasias y PanIN presentan activación de las proteínas fosforiladas Akt y Stat3 en respuesta a la expresión de Egfr, sugiriendo que la activación de las rutas de señalización de PI3k/Akt y Stat3 juegan un importante papel en el desarrollo de dichas lesiones (Figura 28). Finalmente, la presencia de pAkt y pStat3 en el núcleo de células tumorales, también sugiere, que es necesario la activación de estas moléculas efectoras para la progresión tumoral.

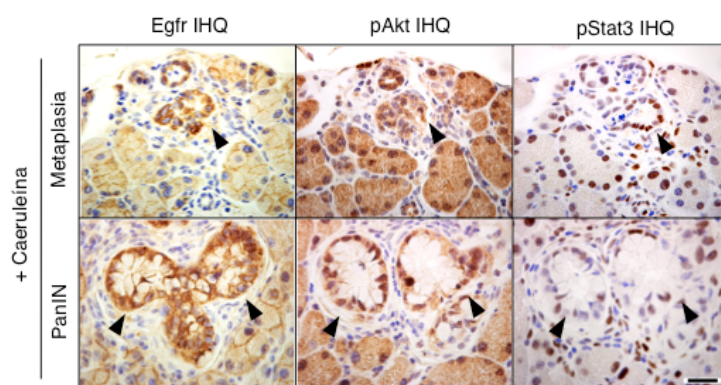


Figura 28: Expresión de Egfr y las proteínas fosforiladas Akt y Stat3 en lesiones de ratones procedentes del protocolo adulto tratados con ceruleína. Panel superior, inmunohistoquímica de Egfr en las metaplasias procedentes de ratones *ElasK-Ras*^{G12V} tratados con ceruleína (Egfr IHQ), Akt fosforilado (pAkt IHQ) y Stat3 fosforilado (pStat3 IHQ) en secciones seriadas. Panel inferior, inmunohistoquímica de Egfr en las lesiones de PanIN procedentes de ratones *ElasK-Ras*^{G12V} tratados con ceruleína (Egfr IHQ), Akt fosforilado (pAkt IHQ) y Stat3 fosforilado (pStat3 IHQ) en secciones seriadas. En ambos paneles las lesiones están señaladas por triángulos negros. La barra de escala representa 20 µm.

6.3.7 Las Líneas celulares humanas de PDAC son dependientes de la señalización de EGFR pero no del oncogén K-Ras

Nuestros resultados demuestran que Egfr es necesario para la iniciación y desarrollo de PDAC en ratones *ElaK-Ras*^{G12V}. Para estudiar la importancia de Egfr en tumores humanos nos planteamos estudiar el papel de este receptor en la proliferación celular de las líneas establecidas derivadas de PDAC humanos. Para ello, seleccionamos 8 líneas celulares comerciales bien caracterizadas, de las cuales 6 presentan mutaciones oncogénicas en el gen *K-Ras*: AsPc1, CFPAC, IMIMPC-2, MIAPaCa, PANC1 y SKPC. Estas líneas celulares presentaban también mutaciones en los supresores tumorales *P16INK4a* y *P53* (Tabla 4). CFPAC y SKPC también presentan mutaciones en SMAD 4. Las otras 2 líneas celulares BxPc3 y T3M4 presentan el alelo salvaje de *K-RAS*. Estas líneas tienen también mutados *P16INK4a* y *P53* y concretamente BxPc3 tiene mutado SMAD 4 (Tabla 7).

Tumor	Mutaciones				EGFR ShRNA
	<i>K-RAS</i>	<i>P16INK4a</i>	<i>P53</i>	<i>SMAD4</i>	% inhibición
AsPc1	G12D	CML	CML	No	72.3%
CFPAC	G12V	Metilado	Mutado	Deleción	5.2%
IMIMPC-2	G12D	Deleción	Mutado	No	32.5%
MIAPaCa	G12C	Deleción	Mutado	No	97.0%
PANC1	G12D	Deleción	Mutado	No	59.9%
SKPC	G12V	Metilado	Mutado	Deleción	08.7%
BxPc3	Salvaje	Mutado	Mutado	Mutado	81.0%
T3M4	Salvaje	Metilado	Mutado	No	90.1%

CML: Cambio del Marco de Lectura

Tabla 7: Líneas celulares humanas de tumores pancreáticos. Se detallan las alteraciones genéticas en el oncogén *K-RAS* y en genes supresores de tumores como *P16INK4a*, *P53* y *SMAD4* de las líneas tumorales pancreáticas. Además del porcentaje de inhibición de cada una de las líneas debido al silenciamiento genético de *EGFR* mediante dos secuencias independientes de shRNA contra *EGFR*.

Para ver el papel de EGFR en las propiedades proliferativas de estas líneas tumorales realizamos el estudio de silenciamiento de *EGFR* usando dos secuencias diferentes de shRNA. Conseguimos una inhibición eficiente la proliferación (>70%) en AsPc1, BxPc3, MIAPaCa y T3M4. Inhibimos de manera parcial las líneas celulares PANC1 e IMIMPC-2, mientras las otras líneas celulares CFPAC y SKPC son resistentes a dicha inhibición (Tabla7). El efecto de la señalización de EGFR en proliferación parece ser independiente de la presencia del oncogén *K-RAS*. El silenciamiento de *EGFR* sólo inhibió la señalización de PI3K, como se ve por la disminución de la fosforilación de AKT y de ERK, en aquellas células que presentan el alelo salvaje de *K-RAS*, pero no en las que lo tienen mutado (Figura 29).

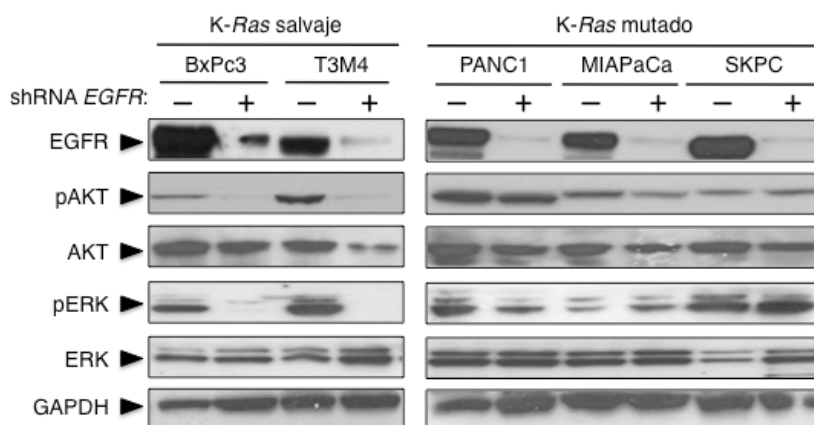


Figura 29: Inhibición de la señalización de EGFR en líneas celulares tumorales humanas. Western blot de la expresión de: EGFR total (EGFR), AKT fosforilado (Ser473) (pAKT), AKT total (AKT), ERK1/2 fosforilado (Thr202/Tyr204) (pERK) y ERK1/2 total (ERK) en lisados celulares de líneas celulares humanas con el alelo salvaje (BxPc3, T3M4) o mutado (MIAPaCa, PANC1, SKPC) de *K-RAS*. Las células fueron infectadas con vectores lentivirales portadoras del control shRNA (-) o del shRNA específico contra la secuencia humana de *EGFR* (+). Las muestras fueron recogidas 10 días postinfección. GAPDH es el control de carga. La migración de las correspondientes proteínas se señala por los triángulos negros.

Cuando analizamos la sensibilidad de estas líneas al tratamiento con Erlotinib (Inhibidor del grupo Tirosina Quinasa de EGFR) vimos que 5 de estas líneas tumorales (3 con el oncogén *K-RAS* mutado: CFPAC, MiaPaCa y SKPC; 2 con *K-RAS* salvaje: BxPc3 y T3M4) eran parcialmente sensibles al tratamiento con Erlotinib (Tabla7). Con esta droga no conseguimos una inhibición completa (IC_{90}) incluso a concentraciones de 200 μ M. La línea SKPC que es sensible al tratamiento con Erlotinib, apenas disminuye la proliferación cuando se realizó el silenciamiento de EGFR (Tabla7). Esta discrepancia puede ser explicada debido a la falta de capacidad de los shRNA de inhibir altos niveles de expresión de EGFR presentes en esta línea celular o por efectos inespecíficos del Erlotinib en otros receptores de la familia ErbB (Figura 30 y Tabla 4).

En paralelo y como control, realizamos el estudio de la inhibición de la señalización de MEK en las líneas celulares humanas con el inhibidor de MEK (PD3325901). CFPAC, IMIMPC-2, MiaPaCa y SKPC, que presentan la mutación en el oncogén *K-RAS*, fueron sensibles al inhibidor. Las líneas que tienen el alelo salvaje de *K-RAS*: T3M4 y BxPc3, son también altamente sensibles al inhibidor de MEK, sugiriendo que estas células pueden tener activada la ruta de señalización de RAS por otros mecanismos independientes de la mutación oncogénica (Tabla 7). Por último, AsPc1 y PANC1 fueron resistentes al tratamiento con el inhibidor de MEK. Es posible que en estas células el oncogén no juegue un papel esencial en el mantenimiento de la proliferación (Tabla 7).

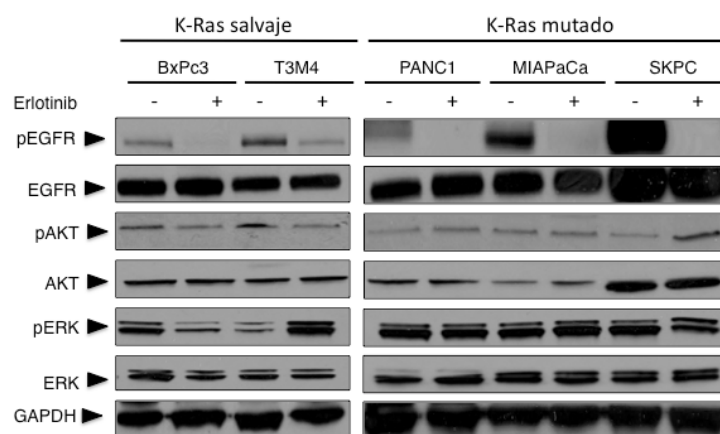


Figura 30: Tratamiento con Erlotinib (100 μ M) en líneas celulares tumorales humanas. Western blot de la expresión de: EGFR fosforilado (Tir1068), EGFR total (EGFR), AKT fosforilado (Ser473) (pAKT), AKT total (AKT), ERK1/2 fosforilado (Thr202/Tyr204) (pERK) y ERK1/2 total (ERK) en lisados celulares procedentes de líneas celulares humanas BxPc3, T3M4, MIAPaCa, PANC1, SKPC. Las células fueron tratadas con DMSO(-) y Erlotinib (+). GAPDH es el control de carga. La migración de las correspondientes proteínas se señala por los triángulos negros.

6.3.8 Egfr no es esencial para el desarrollo de lesiones tumorales en intestino, ni en pulmón inducidas por la expresión del oncogén K-Ras

Todos los resultados mostrados hasta ahora indican que Egfr es imprescindible para la iniciación de tumores pancreáticos en nuestro modelo de ratón. Para comprobar si los resultados descritos hasta ahora son exclusivos del páncreas o son extensivos a otros tipos de tumores en los que el oncogén *K-Ras* juega un papel importante, decidimos eliminar la expresión de Egfr en dos modelos de ratón genéticamente modificados de tumores de pulmón (NSCLC, Non Small Cell Lung Carcinoma) y de intestino. En estos modelos la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} está mediada por la activación de la recombinasa inducible Cre-ERT2. En la línea RERT la recombinasa Cre se encuentra bajo el control del promotor de la subunidad larga de la ARN polimerasa II, y por tanto su expresión es ubicua (40).

En el modelo de pulmón los ratones *RERT*;*K-Ras*^{G12V};*Egfr*^{+/+} (n=17), *RERT*;*K-Ras*^{G12V};*Egfr*^{+/-lox} (n=13) y *RERT*;*K-Ras*^{G12V};*Egfr*^{lox/lox} (n=25) fueron tratados a las 3 semanas de vida (P21) con una única dosis de 4-hidroxi-tamoxifen (4-OHT). En este modelo, los tumores se inducen con la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} (40). Independientemente del genotipo todos los ratones murieron por problemas respiratorios debidos a la carga tumoral entre las 63 y las 72 semanas de edad (Figura 31A). Los ratones presentaban un número similar de adenomas (una media de 15 por ratón) y adenocarcinomas (una media de 3 por ratón), independientemente del genotipo. Estas lesiones son positivas para el marcador SPC (Surfactant Associated Protein C). Ninguno de los tumores analizados, de los tres genotipos estudiados expresaba Egfr por inmunohistoquímica (Figura 31B). Además, el análisis por PCR del ADN de los tumores microdisecados de ratones *RERT*;*K-Ras*^{G12V};*Egfr*^{lox/lox} revelan la delección de los alelos de

Egfr (dato no mostrado). Estos resultados indican que el desarrollo tumoral ha ocurrido en ausencia de *Egfr* (Figura 31B).

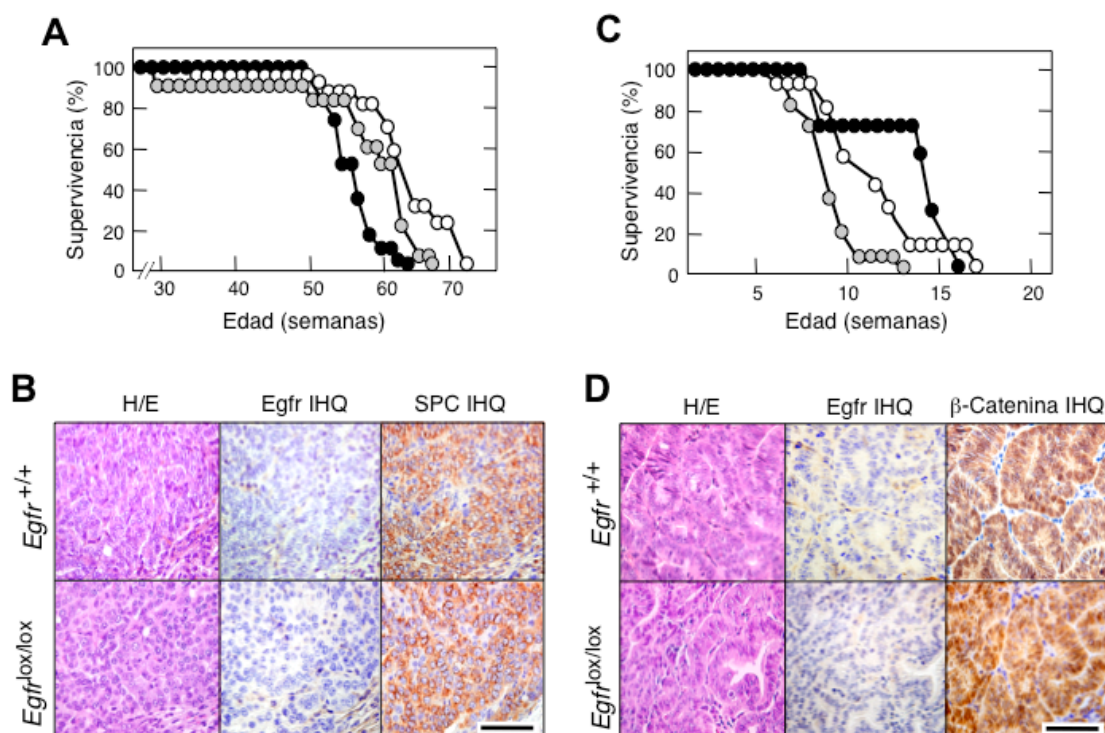


Figura 31: La eliminación de *Egfr* no tiene ningún efecto en la iniciación de los tumores intestinales y pulmonares mediados por *K-Ras*^{G12V}. **A)** Curva de supervivencia de los ratones *RERT;K-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}* (círculos negros), *RERT;K-Ras^{G12V};Egfr^{+/lox}* (círculos grises) y *RERT;K-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* (círculos blancos) tratados con una dosis de 4-OHT a P21 para inducir la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} y la deleción de *Egfr*. **B)** H/E e inmunohistoquímica de EGFR y Proteína Surfactante C (SPC-IHQ) de secciones consecutivas de parafina en adenocarcinomas de ratones *RERT;K-Ras^{G12V}* de 9 meses de edad con alelos salvajes o delecionados de *Egfr*. La barra de escala representa 50 μ m. **C)** Curva de supervivencia de los ratones *RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (círculos negros), *RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{+/lox}* (círculos grises) y *RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (círculos blancos) tratados con 4-OHT a día P21 durante 2 semana (3 veces por semana) para inducir tumores intestinales. **D)** H/E e inmunohistoquímica de *Egfr* (*Egfr* IHQ) y β Catenina (β -Catenina IHQ) de secciones consecutivas de parafina de tumores intestinales en ratones *RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox}* de 2 meses de edad con alelos salvajes o delecionados de *Egfr* (parte inferior). La barra de escala representa 50 μ m.

Resultados similares se obtuvieron, con el modelo para el estudio de los tumores de intestino. En este caso, el desarrollo tumoral se inició con la deleción de *Apc*, que da lugar a la activación de β -Catenina; y el oncogén *K-Ras*^{G12V} acelera la progresión (134). Los ratones *RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (n=7), *RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{+/lox}* (n=17) y *RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (n=16). Se trataron a las 3 semanas de vida (P21) durante dos semanas (3 días por semana) con 4-hidroxi-tamoxifen (4-OHT). Estos ratones, independientemente del genotipo, presentan la misma carga tumoral de adenomas y adenocarcinomas y no sobreviven por encima de las 20 semanas de edad (Figura 31C). Los tumores de estos ratones, independientemente del genotipo, tampoco expresaban *Egfr* (Figura 31D). Además, los tumores

son indistinguibles desde el punto de vista histológico; por inmunohistoquímica se pudo comprobar, que incluso en ausencia de *Apc* se detecta la expresión del marcador de β -Catenina. Así, el desarrollo tumoral en intestino es también independiente de la presencia o no de *Egfr*. (Figura 31D).

Todos estos resultados indican que la señalización de *Egfr* tiene un papel muy específico en el desarrollo de tumores pancreáticos inducidos por el oncogén K-Ras^{G12V}.

6.3.9 La pérdida de senescencia no anula la necesidad de la señalización a través de EGFR durante el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC

Resultados previos del grupo demostraron que en las lesiones benignas o preneoplásicas del páncreas los diferentes tumores expresan marcadores de senescencia (23). En nuestro laboratorio hemos demostrado que las lesiones preneoplásicas de bajo grado desarrolladas por los ratones *ElasK-Ras*^{G12V} del protocolo embrionario expresan los marcadores de senescencia (SABG y p16). Y que cuando eliminamos p16 (ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}) los PanIN no expresan marcadores de senescencia y la progresión tumoral de los ratones del protocolo embrionario es mucho más rápida que en ratones control (ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{+/+}). Además, en ausencia de *Egfr* en ratones *ElasK-Ras*^{G12V} no se produce la iniciación de lesiones, ni cuando el oncogén *K-Ras* se expresa desde estadios embrionarios E16.5 (protocolo prenatal), ni en el protocolo adulto en el contexto de la pancreatitis. Nos planteamos estudiar si la eliminación de los supresores tumorales p16Ink4a/p19Arf (p16/p19) pueden eludir la necesidad de la señalización a través de *Egfr* durante la iniciación tumoral. Así, estudiamos los ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox} y *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} en el protocolo embrionario, es decir, cuando se expresa el oncogén K-Ras^{G12V} y se deleciona *Egfr* y p16/p19 a la vez desde estadios embrionarios (E16.5) en células acinares del páncreas. El páncreas de estos ratones fue examinado a las 16 semanas de edad antes de que los animales mostraran signos evidentes de desarrollo tumoral. El 75% de los animales que presentaban los alelos salvajes de *Egfr* presentaban numerosas lesiones de alto y bajo grado (Figura 32A). Además, 5 animales habían desarrollado al menos un PDAC. Por el contrario, ninguno de los ratones que llevaban los alelos delecionados de *Egfr* (n=6) presentaban lesiones PanIN (ni de bajo, ni alto grado), ni desarrollo de PDAC (Figura 32A).

Se realizó un estudio de supervivencia observando que los ratones con alelos salvajes de *Egfr* tanto en homocigosis (n=12), como en heterocigosis (n=30) sucumbieron a la enfermedad antes de alcanzar los 10 meses de edad (Figura 32B). El análisis postmortem de los ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/+} del protocolo prenatal reveló múltiples lesiones incluyendo PDACs

de carácter invasivo y metastásicos al igual que otros carcinomas anaplásicos que metastatizaban a diferentes órganos corroborando datos previos (1) (39). Sin embargo, los ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} (n=7), sacrificados a un año de edad no presentaban lesiones en el páncreas, excepto 4 animales que tenían 6 lesiones de bajo grado y 2 de alto grado expresaban *Egfr* por inmunohistoquímica (Figura 32C). Se mantienen 17 ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} hasta superar el año de vida, además, a las 80 semanas presentaban buenas condiciones de salud.

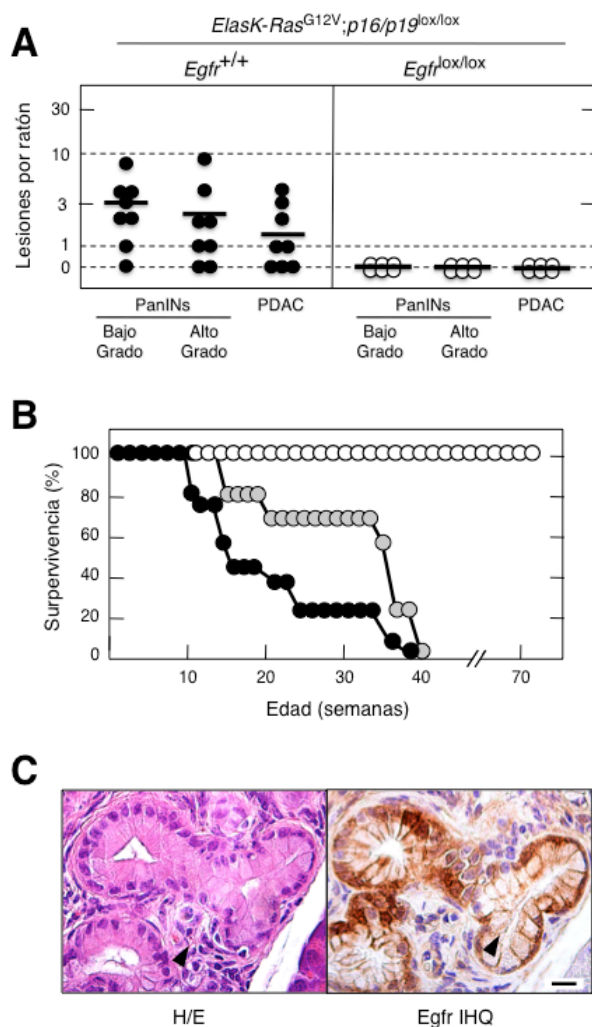


Figura 32: La pérdida de los supresores tumorales *p16/p19* no elimina la necesidad de la señalización a través de EGFR durante el desarrollo de las lesiones. **A)** Número de lesiones por ratón de bajo y alto grado de PanIN y PDAC en el protocolo embrionario de ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/+} (círculos negros) y *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} (círculos blancos). Las barras horizontales indican la media de las lesiones por ratón y genotipo. **B)** Curva de supervivencia de los ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/+} (círculos negros), *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/lox} (círculos grises) y *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} (círculos blancos) del protocolo embrionario. **C)** H/E e inmunohistoquímica positiva de *Egfr* (*Egfr* IHQ) de dos secciones consecutivas de ratón *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox}. La barra de escala representa 50 μm.

Estas observaciones indican que aunque eliminemos la senescencia mediante la inactivación de los supresores tumorales *p16/p19* las células acinares que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} siguen necesitando la señalización a través de *Egfr* para la iniciación tumoral. Todos estos datos concuerdan con los resultados obtenidos *in vitro*, ya que la transdiferenciación acino-ductal de los explantes acinares que no expresan *Egfr* en ausencia de *p16/p19* es menos eficiente que los que tiene los alelos salvajes de *Egfr* (6.3.3).

La pérdida de los supresores tumorales p16/p19 también acelera el desarrollo tumoral en el protocolo adulto en el contexto de la pancreatitis crónica (39). El páncreas de ratones *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (n=7), un año después de la expresión de *K-Ras^{G12V}*, es decir, 8 meses después de la inducción de pancreatitis crónica por el tratamiento con ceruleína, no presentaba lesiones PanIN ni PDAC (dato no mostrado), al igual que sucede en el protocolo embrionario. Así, los ratones control, *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (n=10) sobrevivieron una media de 40 semanas y presentaban múltiples lesiones PanIN y PDAC. En algunos casos con invasión perineural, invasión de la pared intestinal y metástasis en linfonódulos, como previamente se describió en (39). Estas observaciones indican que el requerimiento de la señalización de Egfr durante el desarrollo de las lesiones de PanIN y PDAC no puede ser compensada por la pérdida de los supresores tumorales p16/p19 ni siquiera en el contexto de la respuesta inflamatoria generada por la pancreatitis.

6.3.10 La pérdida de p53 provoca la activación de otras vías de señalización independientes de Egfr

Los PDAC humanos presentan mutaciones en diferentes supresores tumorales: *P53*, *SMAD4* o *BRACA2* (54). Además, los ratones que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* durante el desarrollo embrionario en ausencia de p53 desarrollan lesiones agresivas de PanIN y PDAC que resultan en la muerte de los animales en sus primeros 4-5 meses de vida (41, 52). Resultados similares fueron obtenidos en ratones con la expresión adulta del oncogén *K-Ras^{G12V}* en el contexto de la pancreatitis (39). Para examinar el efecto de la eliminación de *Egfr* en ausencia de *p53*, generamos los ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* y *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}*. Los animales se sacrificaron a las 10 semanas de edad antes de que mostraran signos de enfermedad debido al desarrollo tumoral. Los ratones control que llevaban los alelos salvajes de *Egfr* (n=7) presentaban abundantes lesiones PanIN de bajo grado y una media de 10 lesiones PanIN de alto grado, además de una media de 4 PDAC por ratón. Además, los ratones que llevaban los alelos condicionales de *Egfr* (n=5) también presentaban lesiones neoplásicas aunque con menor incidencia (Figura 33A). Por lo tanto, los ratones que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* en ausencia de *p53* y de *Egfr* desarrollan lesiones, aunque menos y de progresión más lenta. Estos resultados concuerdan con los obtenidos *in vitro* (6.3.3). Al eliminar p53 en nuestro modelo de ratón se produce un aumento y aceleración de la transdiferenciación acino-ductal e incluso, en ausencia de *Egfr* se forman metaplasias *in vitro*.

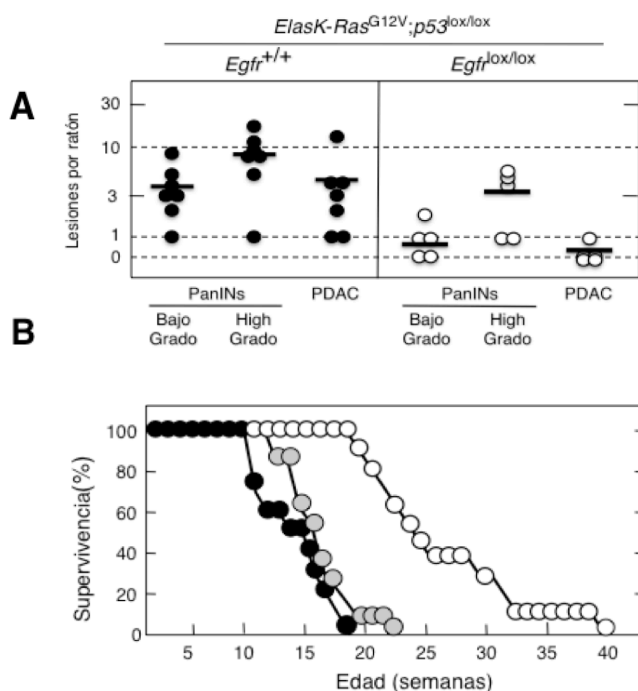


Figura 33: La pérdida de *Egfr* retrasa pero no previene el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC en ausencia de *p53* en el protocolo embrionario. A) Número de lesiones preneoplásicas de alto y bajo grado y PDAC por ratón *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (círculos negros) y *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (círculos blancos), en el protocolo embrionario, analizados a las 10 semanas. **B)** Curva de supervivencia de los ratones del protocolo embrionario *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (círculos negros), *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/lox}* (círculos grises) y *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (círculos blancos).

Los ratones que llevan los alelos salvajes de *Egfr* (n=10) morían alrededor de las 20 semanas de edad con una media de supervivencia de 12 semanas (Figura 33B). Resultados parecidos se obtuvieron con ratones heterocigotos (n=13) (Figura 33B). Los ratones que se sacrificaban era debido a que presentaban signos de enfermedad terminal. En el análisis histológico del páncreas de estos ratones pudimos comprobar la existencia de numerosas lesiones PanIN y PDAC incluyendo una metástasis pulmonar, en uno de los animales heterocigotos para el alelo de *Egfr*. En ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (n=13) también se desarrollan lesiones preneoplásicas de bajo y alto grado al igual que tumores (Figura 33A). Además, 3 de estos ratones también presentaban metástasis macroscópicas en diferentes localizaciones como: peritoneo, diafragma, hígado y pulmón. Sin embargo, los ratones en los cuales se había delecionado *Egfr* llegaban a vivir por hasta las 40 semanas de vida. Lo que significaba un aumento en la supervivencia del 83% comparado con los que tenían los alelos salvajes de *Egfr* (22 frente a 12 semanas) (Figura 33B).

Resultados similares se obtenían en ratones que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* durante la etapa adulta y que eran tratados con ceruleína durante 3 meses. Los ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (n=26) sobrepasan las 60 semanas de vida, con una media de 38 semanas. Los ratones heterocigotos para *Egfr* (n=8) llegan a vivir 35 semanas, con una media de supervivencia de 27 semanas. Los ratones con los alelos silvestres de *Egfr* vivían una media de 12 semanas de edad (39). Por tanto, la eliminación de *Egfr* resulta en un incremento de la tasa de supervivencia en un 40%. (Figura 34).

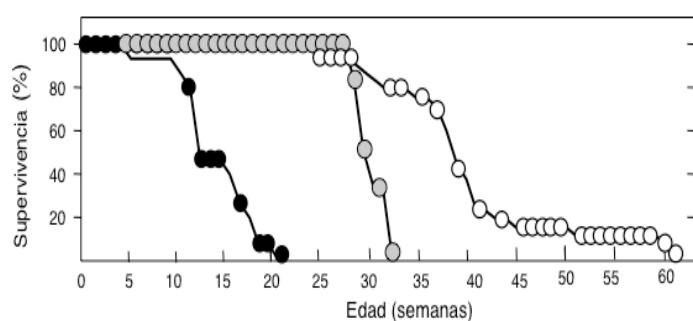


Figura 34: La pérdida de Egfr retrasa pero no previene el desarrollo de PanIN y PDAC en ausencia de p53, en el protocolo adulto. Curva de supervivencia del protocolo adulto de los ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (círculos negros), *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/-lox}* (círculos grises) y *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (círculos blancos).

En este caso el desarrollo tumoral no fue debido a la recombinación incompleta de los alelos de *Egfr*, porque las lesiones de PanIN y los PDAC no expresaban niveles detectables de Egfr por inmunohistoquímica (Figura 35). Además, el análisis por PCR procedente del ADN aislado de las células tumorales también mostraban la perfecta excisión de los alelos floxeados de *Egfr* (datos no mostrados).

Finalmente el análisis histopatológico de las lesiones PanIN y PDAC de ratones en los que se ha delecionado *p53* y *Egfr* no revela diferencias comparado con los controles (Figura 35). Estos resultados indican que la pérdida de *p53* activa otras rutas de señalización, eliminando la necesidad de la señalización a través de Egfr para el desarrollo tumoral.

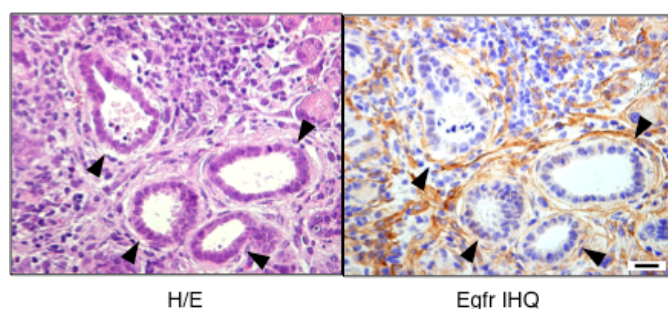


Figura 35: Lesiones PanIN de alto grado y PDAC. Tinción de hematoxilina-eosina (H/E) e inmunohistoquímica contra Egfr (Egfr IHQ) de secciones seriadas. Las lesiones PanIN de alto grado (triángulos) y PDAC. Egfr está presente en estroma y no en células tumorales. Barra de escala representa 50 μ m.

6.3.11 La inhibición de la señalización de EGFR mediante Erlotinib interfiere en el desarrollo de PDAC *in vivo*

Estudios previos muestran que Gefitinib (inhibidor del grupo Tirosina Quinasa de Egfr) puede ralentizar la progresión de las lesiones precursoras hacia el desarrollo de PDAC en aquellos ratones que expresan el oncogén *K-Ras^{G12D}* (100). Para determinar si Egfr es necesario para la progresión de las lesiones PanIN en un modelo más agresivo, tratamos los ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* de 6 semanas de edad con el vehículo o con Erlotinib a una dosis de 100 mg/kg diariamente durante 4 semanas. Un pequeño grupo de ratones (n=3) fue sacrificado justo antes del tratamiento revelando la presencia de lesiones de PanIN de bajo y alto grado de pequeño tamaño, al inicio del tratamiento. Además, dos de estos ratones habían desarrollado pequeños PDACs

6.- Resultados

(Figura 36). Al final de las 4 semanas de tratamiento, todos los ratones que fueron tratados con el vehículo (n=7) presentaban un incremento importante en el número de lesiones (Figura 36). Por el contrario, en el grupo tratado con Erlotinib encontramos 3 de 14 ratones sin lesiones y otros 3 ratones con lesiones PanIN pero sin PDAC (Figura 36). El conjunto de los ratones tratados con Erlotinib tenían menos lesiones que el grupo control, indicando un limitado pero reproducible y estadísticamente significativo efecto terapéutico de este inhibidor de EGFR en el desarrollo de tumores (Figura 36).

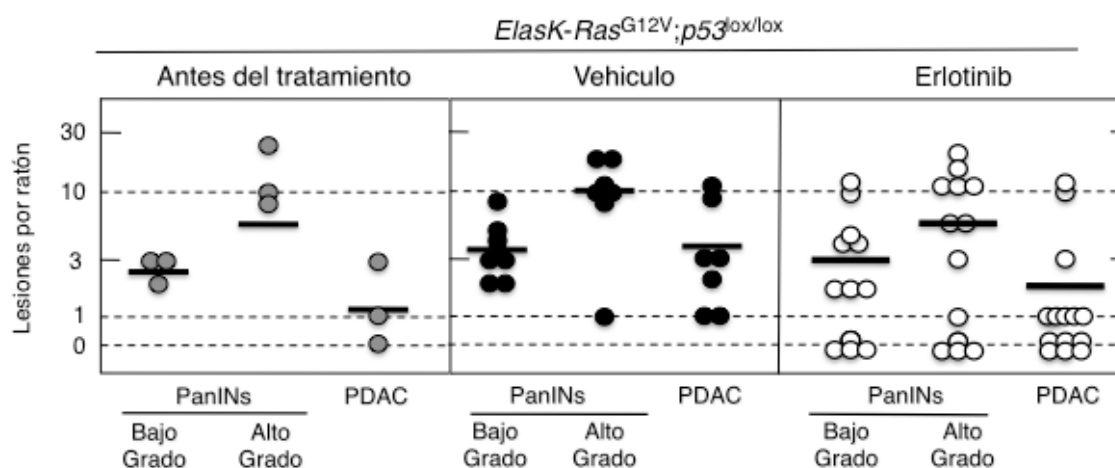


Figura 36: La inhibición de Egfr mediante el tratamiento con Erlotinib reduce el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC. Cuantificación del número de lesiones PanIN de alto y bajo grado y tumores en ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* (círculos grises) de 6 semanas de edad, antes del inicio del tratamiento, al finalizar el tratamiento con 10 semanas de edad, tratados con el vehículo (círculos negros) y tratados con 100mg/kg de Erlotinib durante 4 semanas (círculos blancos). Las barras horizontales indican la media del número de lesiones por ratón. El descenso en el número de PDACs en los ratones tratados con Erlotinib fue estadísticamente significativo ($p < 0,005$).

El análisis inmunohistoquímico de las lesiones de los ratones tratados con Erlotinib durante 4 semanas revela una importante inhibición de pAkt pero no de pStat3 o de pErk cuando se compara con muestras procedentes de animales tratados con el vehículo (Figura 37A). Como control adicional, analizamos el estatus de pAkt, pStat3, pErk en ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* con los alelos salvajes o condicionales de *Egfr*. Como esperamos la eliminación de la expresión de *Egfr* resulta en la inhibición de pAkt, pero no de pStat3, ni de pErk (Figura 37B). Estos resultados sugieren que la pérdida de p53 podría activar la ruta de señalización de PI3k por un mecanismo independiente de EGFR.

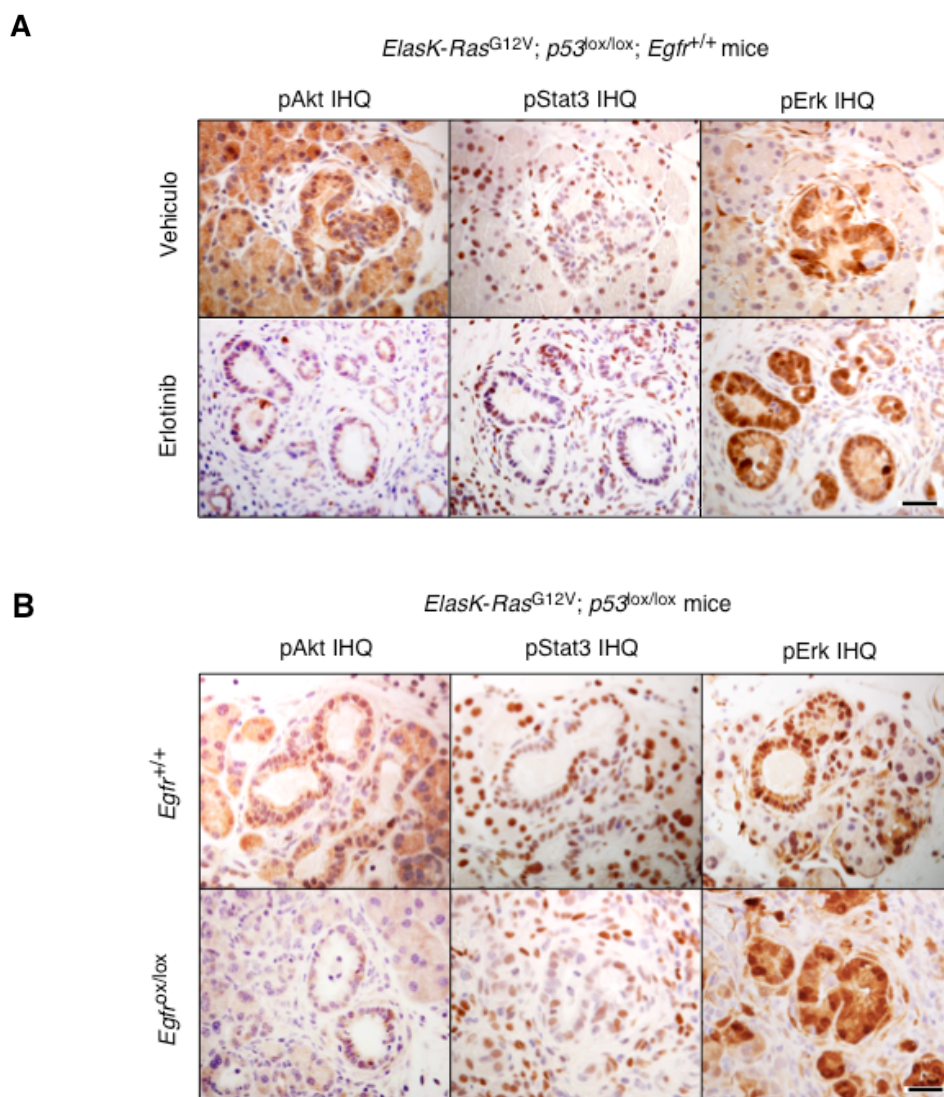


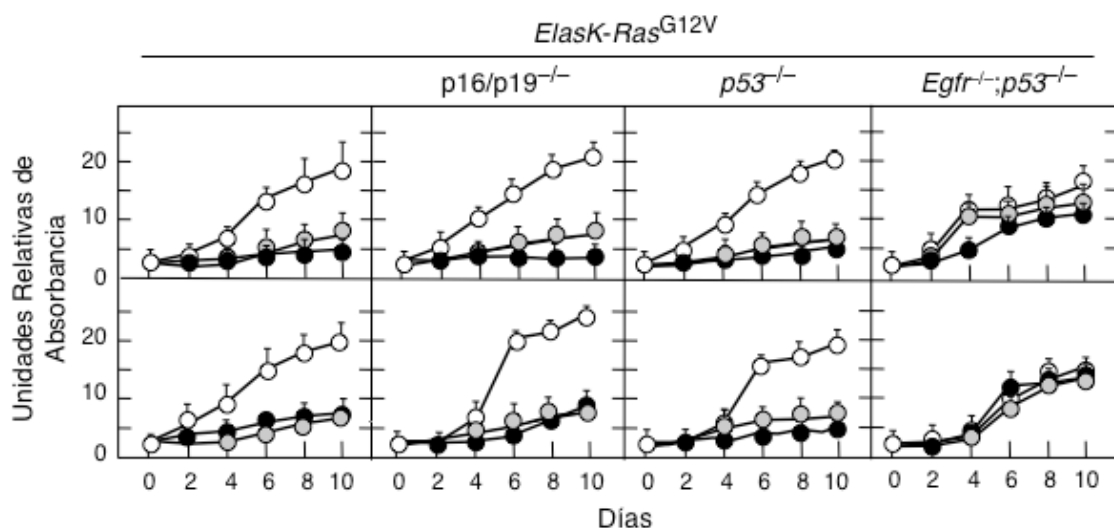
Figura 37: Inmunohistoquímica de secciones de parafina seriadas procedentes de ratones *ElasK-Ras^{G12V}; p53^{lox/lox}*. A) Expresión de Akt fosforilado (pAkt IHQ), Stat3 fosforilado (pStat3 IHQ) y Erk fosforilado (pErk IHQ) en secciones seriadas de parafina de páncreas de ratones *ElasK-Ras^{G12V}; p53^{lox/lox}; EGFR^{+/+}* del protocolo embrionario que han sido tratados con vehiculo (panel superior) o con Erlotinib (panel inferior) durante 4 semanas. La barra de escala representa 20 μ m. **B)** Expresión de Akt fosforilado (pAkt IHQ), Stat3 fosforilado (pStat3 IHQ) y Erk fosforilado (pErk IHQ) en lesiones de ratones *ElasK-Ras^{G12V}; p53^{lox/lox}; Egfr^{+/+}* (panel superior) y *ElasK-Ras^{G12V}; p53^{lox/lox}; Egfr^{lox/lox}* (panel inferior) del protocolo embrionario. La barra de escala representa 20 μ m.

6.3.12 La señalización de Egfr es necesaria para la proliferación de los explantes tumorales procedentes de PDAC de ratón

El silenciamiento de la expresión de EGFR mediante dos secuencias independientes de shRNA inhibió la proliferación de los explantes tumorales procedentes de los PDAC aislados de ratones de diferente genotipo: *ElasK-Ras^{G12V}*, *ElasK-Ras^{G12V}; p16/p19^{lox/lox}* y *ElasK-Ras^{G12V}; p53^{lox/lox}* (Figura 38A). Estos explantes también fueron sensibles al tratamiento con Erlotinib (Figura 38B). Erlotinib tiene un efecto citostático, por lo que la completa inhibición

requiere un contacto continuo con la droga (dato no mostrado).

A



B

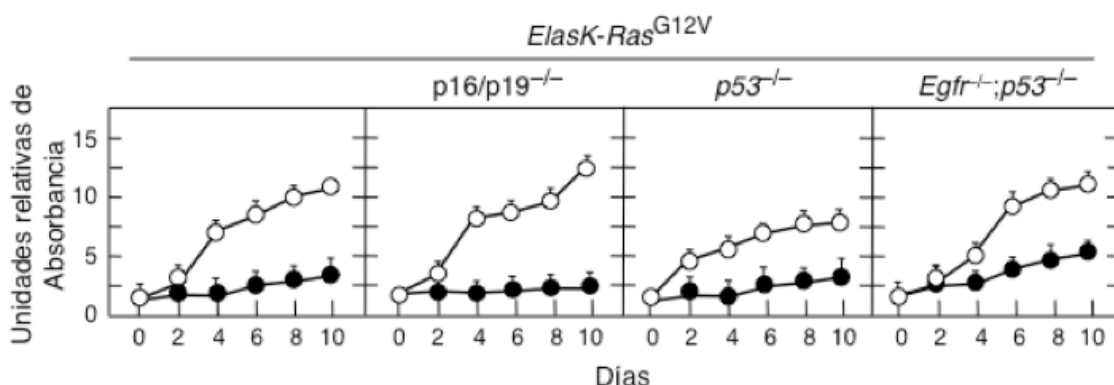


Figura 38: La señalización a través de EGFR es necesaria para la proliferación de los explantes tumorales procedentes de PDAC de ratón. A) Explantes celulares derivados de PDAC de ratón de los genotipos indicados fueron infectados con 2 vectores lentivirales expresando 2 secuencias independientes de shRNA contra *Egfr* (círculos negros y grises) o shRNA control (círculos blancos). **B)** Explantes celulares derivados de PDAC de ratón de los genotipos indicados fueron tratados con Erlotinib (círculos negros) o con vehículo (círculos blancos). Erlotinib fue usado a 50 μ M (correspondiendo a la media de la IC_{50} para estas líneas celulares). En A y B los resultados son la media de dos experimentos llevados a cabo con 3 diferentes explantes celulares estudiados por triplicado.

El silenciamiento de la expresión de *Egfr* en estos explantes celulares inhibía significativamente la fosforilación de Stat3 y aunque en menor grado, también la fosforilación de las proteínas Erk (Figura 39). Lo más llamativo fue, la fosforilación de Akt, un marcador de la activación de la ruta de señalización de PI3k/Akt fue inhibida en todos los explantes celulares excepto los explantes knockout para *p53*, lo que podría explicar mecanismos alternativos que en ausencia de *p53* dan lugar al desarrollo de PanIN y PDAC (Figura 39).

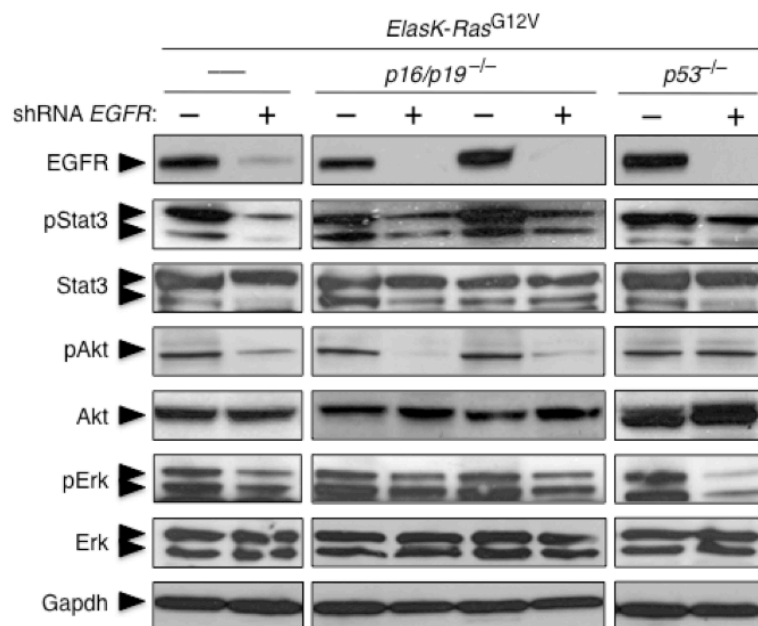


Figura 39: Silenciamiento de la expresión de EGFR en explantes celulares procedentes de PDAC de ratón. Western blot de la expresión de: Egfr total (Egfr), Stat3 total (Stat3), Stat3 fosforilado (Tyr705) (pStat3), Akt fosforilado (Ser473) (pAkt), Akt total (Akt), Erk1/2 fosforilado (Thr202/Tyr204) (pErk) y Erk1/2 total (Erk) expresión en lisados celulares procedentes de explantes tumorales de PDAC obtenidos de ratones *Elask-Ras^{G12V}*, *Elask-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox}* y *Elask-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* del protocolo embrionario. Las células fueron infectadas con el vector lentiviral llevando el control de shRNA (-) o un shRNA específico de Egfr (+). Las muestras fueron recogidas el día 10 post-infección lentiviral. GAPDH: control de carga. La migración de las correspondientes proteínas se señala con triángulos negros.

6.3.13 Cooperación de la señalización de PI3K y Stat3 en ausencia de Egfr

Los explantes celulares procedentes de PDAC de ratones que han perdido *Egfr* y *p53* nos permite estudiar rutas de señalización adicionales que contribuyan al desarrollo tumoral.

El tratamiento con Erlotinib disminuyó parcialmente la proliferación de los explantes procedentes de ratones *Elask-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}*. Estos resultados pueden ser debidos a los efectos inespecíficos del inhibidor; ya que como cabía esperar, los shRNA contra la secuencia de *Egfr* no tiene ningún efecto inhibitorio sobre la tasa de proliferación en los animales *Elask-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (Figura 40A).

Una de las rutas efectoras más importantes de Egfr es PI3K/Akt. La inhibición directa de PI3K podría ilustrar si los efectos de Egfr son principalmente vía PI3K. Para ello usamos el inhibidor ETP-46992 un inhibidor que se administra por vía oral, selectivo de la subunidad p110 α y la subunidad catalítica δ de PI3K (94).

Una combinación del inhibidor de PI3K con Erlotinib resulta en una importante

disminución de la proliferación de los explantes celulares incluso en ausencia de *Egfr* y *p53*.

Como se indica en la Figura 39, la inhibición de EGFR en ratones *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}*, bloquea la fosforilación de Akt pero no de Stat3. Sin embargo, el silenciamiento de la expresión de Stat3 no inhibe la proliferación en los explantes celulares independientemente del genotipo (Figura 40).

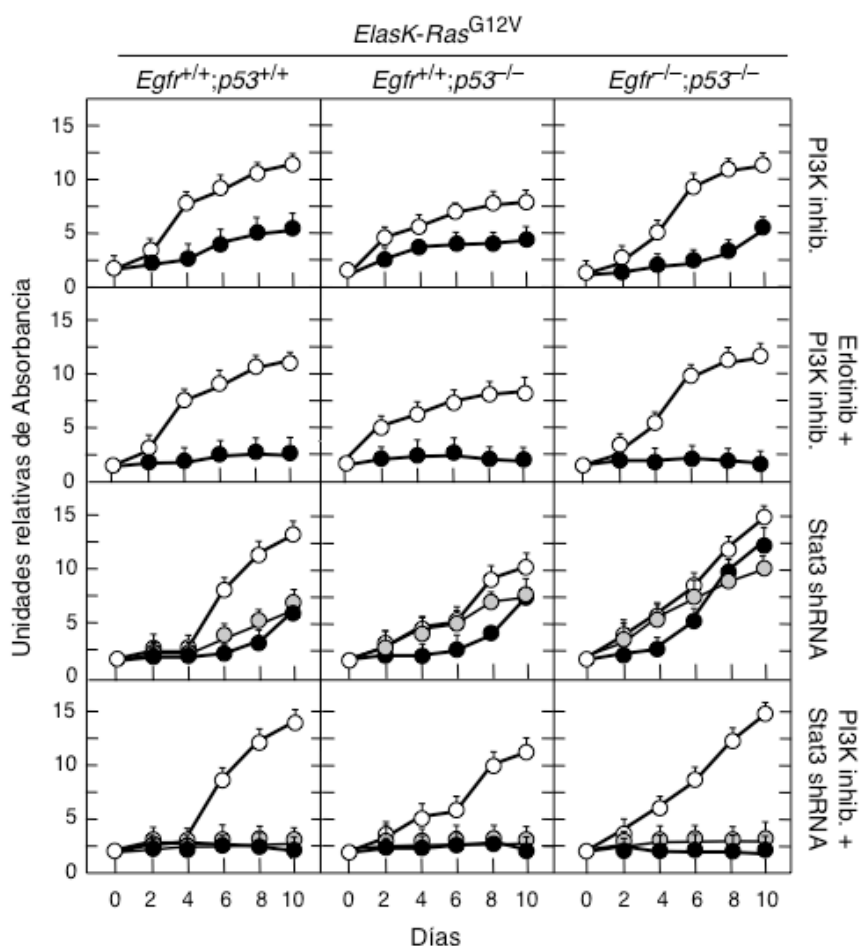


Figura 40: Estudio de inhibición de Stat3 y PI3K en explantes tumorales de ratón. Los explantes celulares derivados de PDAC de ratón de los genotipos indicados fueron tratados con los inhibidor/es indicados y/o infectados con vectores lentivirales que expresan dos secuencias independientes de shRNA contra *Stat3* (círculos negros y grises). Los controles se trataron con vehículo (DMSO) o con vector lentiviral control (círculos blancos). Erlotinib fue usado a 50 μ M, que corresponde a la media de IC_{90} de los explantes tumorales. ETP-46992, inhibidor selectivo de PI3K fue usado a una concentración final de 20 μ M que corresponde a la media de IC_{90} de los explantes tumorales. Cada gráfico representa la media de dos experimentos llevados a cabo con tres diferentes explantes celulares hechos por triplicado.

Estas observaciones indican que la ruta de señalización de STAT3 puede contribuir al desarrollo tumoral al menos en ausencia de p53. Por tanto, para el tratamiento de tumores pancreáticos en clínica, puede ser necesario inhibir al menos estos 4 diferentes rutas de señalización: K-Ras, Egfr, PI3K y Stat3.

Discusión

El adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) presenta una baja incidencia, y sin embargo representa la cuarta causa de muerte por cáncer en los países Occidentales (48). Los estadios más tempranos de la enfermedad no suelen dar síntomas clínicos y empieza a ser aparente cuando el tumor ha invadido los tejidos adyacentes o ha dado lugar a metástasis (157). El retraso en el diagnóstico hace que el porcentaje de pacientes que sobrevivan más de 5 años tras el diagnóstico sea menor del 5% (65). Por tanto, uno de los grandes retos que se presenta en el tratamiento del cáncer de páncreas es el diagnóstico en etapas tempranas (109).

Estudios genéticos, histológicos y clínicos han identificado tres tipos de lesiones preneoplásicas diferentes como potenciales precursoras del PDAC (88). Entre ellas destacan las lesiones PanIN, IPMN y MCM. Las lesiones PanIN son las mejor caracterizadas, tanto a nivel anatomopatológico como a nivel molecular. Aunque no se conoce exactamente la célula de origen del PDAC, actualmente se acepta que la célula acinar sufre un proceso de transdiferenciación acino-ductal dando lugar a las metaplasias que posteriormente progresan a lesiones preneoplásicas de bajo grado (PanIN1) y que dará lugar a las lesiones de alto grado PanIN2 y posteriormente a las lesiones PanIN3 o carcinoma *in situ* y por último al desarrollo de PDAC (90). Existe una buena correlación entre la progresión tumoral y la acumulación de alteraciones genéticas. Así, el oncogén *K-RAS* está presente en más de un 90% de los casos en los primeros estadios PanIN1. En lesiones más avanzadas como en PanIN2 existen deleciones y metilaciones de *P16/P19* y en el carcinoma *in situ* están presentes mutaciones de otros genes supresores de tumores como *P53*, *SMAD4*, *BRACA2* (91). Además, un estudio detallado de diversos PDAC procedentes de pacientes demostró que en estos tumores existen 12 vías de señalización alteradas. Por tanto, para realizar un tratamiento más eficaz se deberían desarrollar diferentes fármacos que actuasen frente a varias rutas de señalización (67). Un mayor conocimiento de los factores moleculares implicados en el desarrollo del PDAC será esencial para poder desarrollar mejores estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas para luchar contra esta enfermedad mortal (173).

El desarrollo de GEMMs, nos pueden ayudar a elucidar el papel de diferentes mutaciones genéticas tanto en el desarrollo de las lesiones precursoras de PDAC como su evolución a PDAC. Así, la deleción de *Smad4* en páncreas junto con la expresión de *K-Ras*^{G12D} da lugar a la aparición de IPMN (7) y MCM (63). La combinación de la pérdida de *p16/p19* y de la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D} en células correspondientes a precursores del desarrollo de las diferentes estirpes celulares pancreáticas en las etapas tempranas (1) o en células acinares a partir de estadios embrionarios (E.16.5), da lugar a la aparición de carcinomas anaplásicos, un tipo tumoral muy agresivo (39). Las células acinares adultas de ratón que son positivas para *Pdx1* y al mismo tiempo expresan el oncogén *K-Ras*^{G12D}, junto con la inactivación de *p53* o *p16*^{Ink4a}/*p19*^{Arf}, se

transforman para dar lugar al desarrollo de lesiones PanIN de alto grado, que posteriormente progresan a PDAC (35).

En nuestro laboratorio, se ha generado un modelo de ratón (*ElasK-Ras^{G12V}*) que permite controlar, tanto a nivel celular como en el tiempo la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}*, uno de los oncogenes iniciadores de los tumores de páncreas presente en un 90% de las lesiones PanIN1 y que además, se encuentra mutado en la mayoría de los PDAC. En este modelo, el oncogén se expresa en las células acinares (y probablemente en las centroacinares). Además podemos seguir su expresión a lo largo del desarrollo tumoral debido a la expresión de la betagalactosidasa de forma bicistrónica con el oncogén *K-Ras^{G12V}*. Podemos controlar la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* en el tiempo. En el protocolo embrionario, en ausencia de doxicilina, (nuestro modelo es Tet-Off) se expresa el oncogén *K-Ras^{G12V}* a partir de estadios embrionarios E.16,5. En el protocolo adulto, cuando mantenemos a los animales con doxiciclina, la Cre está inactiva, y al retirarla (a dos meses de edad, en la etapa adulta) conseguimos la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* en las células acinares del páncreas. Este protocolo no da lugar a lesiones, ya que como se ha explicado en otras ocasiones es necesario la cooperación de la pancreatitis crónica para que las células acinares adultas sean susceptible a la transformación por el oncogén *K-Ras^{G12V}* (41).

Casi todos los estudios realizados con GEMMs analizan el desarrollo tumoral iniciado en estadios embrionarios (50),(41), (35), (27). Sin embargo, en humanos los tumores de páncreas se producen por mutaciones somáticas adquiridas durante la etapa adulta, y no durante el desarrollo embrionario. Nuestro modelo de ratón de cáncer de páncreas está diseñado para poder expresar el oncogén *K-Ras^{G12V}* en la edad adulta, permitiéndonos estudiar una situación más parecida al desarrollo de este tipo de tumor en humanos. Resultados en nuestro grupo han mostrado que las células acinares adultas no son susceptibles a la transformación por el oncogén *K-Ras^{G12V}* (41). Lo más llamativo es que tampoco se produce transformación acino-ductal en presencia del oncogén *K-Ras^{G12V}* y de la pérdida de los supresores tumorales *p16/p19* o *p53*, dos de los eventos más importantes que suceden en los estadios más avanzados (PanIN2/3) de la progresión del cáncer de páncreas.

A pesar de que las células acinares presentan resistencia a la transformación, sí mantienen su capacidad de proliferación y adquieren propiedades tumorigénicas en respuesta a ciertos daños (71). Así, el tratamiento con ceruleína en animales adultos restaura la permisividad de las células acinares a la transformación por el oncogén *K-Ras^{G12V}* (41) y (39). No obstante, la pancreatitis por si solo no coopera con la pérdida de estos supresores tumorales para iniciar la transformación de las células acinares, sino que es necesario que coexista la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}*.

Estos resultados indican que el oncogén *K-Ras*^{G12V} y la pancreatitis son esenciales para la iniciación de los tumores pancreáticos en ratones adultos.

Si además de la pancreatitis y de la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}, tiene lugar la pérdida de supresores tumorales como *p16/p19* y *p53* se exagera el proceso de transformación y los tumores que se forman presentan características invasivas y metastásicas (41).

Cabe destacar que los tumores originados durante el desarrollo embrionario son más agresivos que los que se generan en la etapa adulta (41). Lo que sugiere que muchas de las rutas de señalización que están activas en las células acinares durante el desarrollo embrionario, en la etapa adulta están silenciadas o presentan una menor señalización. Por eso, los trabajos de esta tesis se han desarrollado en ambos protocolos, en el embrionario y en el adulto en presencia de ceruleína.

7.1 Estudio de los fenómenos de senescencia

Nuestros resultados indican que las células acinares que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} tanto en el protocolo prenatal como en el postnatal, no expresan marcadores típicos de senescencia como SABG. Detectamos la expresión de los marcadores de senescencia como SABG y p16 en las primeras etapas de la transformación acino-ductal, en las metaplasias y en las lesiones PanIN de bajo grado desarrolladas por los animales que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V}. Además, dicha expresión se correlaciona inversamente con marcadores de proliferación como Ki67. Por lo que el fenómeno de senescencia no se induce sólo por la expresión de *K-Ras*^{G12V}, sino que precisa también la transformación celular. Se desconocen los factores que desencadenan dicha transformación. Nuestros resultados y los de otros grupos han demostrado que previo a la transformación se induce la expresión de Sox9 (75) y Egfr (4) (108), pero de momento se desconocen los eventos desencadenantes de dicha inducción tras la expresión del oncogén *K-Ras*.

La expresión de los marcadores de senescencia se pierde en las lesiones más agresivas (PanIN de alto grado y PDAC), que presentan además expresión elevada de Ki67. Lo que significa que aquellas lesiones que presenten el programa de senescencia activo no progresarán a estadios más agresivos; por el contrario, aquellas lesiones que progresan son las que pierden este mecanismo de defensa.

Como se ha comprobado se puede detectar expresión de p16 en las lesiones PanIN de bajo grado junto con otros marcadores de senescencia, como la tinción SABG. En cambio en ratones *ElasK-Ras^{G12V};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox}* pertenecientes al protocolo prenatal, la progresión de las lesiones es muy rápida. Presentan mayoritariamente lesiones PanIN de alto grado y PDAC, negativas para los marcadores de senescencia (SABG) (39). Indicando que los supresores de tumores p16/p19 contribuyen de manera esencial en la activación del programa de senescencia.

7.1.1 La pancreatitis contribuye al desarrollo de lesiones PanIN debido a la inhibición de la senescencia inducida por oncogenes

Nuestros resultados, muestran que las lesiones PanIN de bajo grado que desarrollaron los ratones del protocolo prenatal expresaban marcadores de senescencia (tinción SABG y p16). En cambio, en presencia de pancreatitis los ratones desarrollaban pocas lesiones PanIN de bajo grado y las que presentaban eran negativas para los marcadores de senescencia. La pancreatitis, a través de su componente inflamatorio, contribuye al desarrollo de lesiones PanIN debido a que anula el mecanismo de senescencia inducida por oncogenes (OIS), mecanismo de defensa natural que impide la progresión de las lesiones y que ocurre también en otros tipos de lesiones benignas que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* (22) (39).

Como se ha comentado anteriormente, en el protocolo adulto, es necesaria la inducción de la pancreatitis junto con la expresión del oncogén *K-Ras^{G12V}* para que tenga lugar la generación de lesiones en páncreas. Además, episodios limitados de pancreatitis, de un mes de duración, son suficientes para producir el desarrollo de lesiones PanIN, siempre y cuando las células acinares en las que se ha producido el daño expresen el oncogén *K-Ras^{G12V}* (39). El aumento de la duración de la pancreatitis produce un incremento del número de lesiones PanIN de alto grado y PDAC que aparecen además con menor latencia (41). Se desconoce la razón por la que la pancreatitis induce la aparición de las lesiones PanIN. Una posible explicación es que la pancreatitis incrementa el número de células susceptibles a la transformación por el oncogén *K-Ras^{G12V}* y/o facilite la transdiferenciación de las células acinares adultas, incrementando su susceptibilidad a la transformación por el oncogén *K-Ras^{G12V}*.

En esta tesis se ha comprobado que las lesiones PanIN de bajo grado que tienen lugar en el momento de la pancreatitis tanto en el protocolo embrionario, como en el protocolo adulto, no presentan marcadores de senescencia. En ambos protocolos, los marcadores de senescencia sólo se detectan en metaplasias y en lesiones PanIN de bajo grado tras cesar la respuesta inflamatoria. Estas observaciones sugieren que, uno de los mecanismos por los cuales la inflamación inducida por la pancreatitis contribuye a la progresión de los PDAC en ratón, es debido a la eliminación de

la barrera de senescencia, que impide la progresión de las lesiones PanIN de bajo grado a lesiones más agresivas. Además, la respuesta inflamatoria retrasa la reparación de las células de páncreas que no se han transformado y estimula la expansión de las lesiones preneoplásicas.

Debido a que la respuesta inflamatoria es uno de los mecanismos que facilita la progresión de las lesiones PanIN de bajo grado a lesiones más agresivas, incluso a PDAC, se planteó tratar a los ratones con antiinflamatorios, concretamente con Sulindac (inhibidor dual de las enzimas COX1/2), para estudiar el beneficio de la inhibición de la inflamación en la progresión de las lesiones. Los animales tratados con Sulindac, durante tres meses, tras la exposición a la ceruleína, presentaban un páncreas prácticamente normal, con sólo unas pequeñas áreas de atrofia y un limitado número de células inflamatorias. Aunque el tratamiento con Sulindac mostró un efecto limitado sobre las lesiones PanIN de bajo grado, sí causa una reducción importante en el número de las lesiones de alto grado y PDAC, cercana al 75%. Estas observaciones sugieren que además de la eliminación de la barrera de senescencia, la inflamación inducida por episodios de pancreatitis contribuye al desarrollo de lesiones PanIN en los ratones debido a otros mecanismos.

7.1.2 La inflamación inducida por la pancreatitis bloquea la senescencia en lesiones preneoplásicas (PanIN) de pacientes

Como se ha explicado anteriormente, la pancreatitis es uno de los factores de riesgo conocidos y más importantes para el desarrollo de PDAC en humanos. Exactamente, los pacientes con pancreatitis crónica, tienen un riesgo 10 veces mayor de desarrollar PDAC (84) y (92). Sin embargo, la mayoría de los pacientes que desarrollan PDAC no presentan una historia de pancreatitis crónica. Por tanto, es importante determinar si distintos tipos de pancreatitis menos agresivas, como las asintomáticas o episodios esporádicos de las mismas, pueden también incrementar el riesgo de desarrollo de PDAC. El análisis postmortem realizado en autopsias de individuos sanos revelan la presencia de lesiones PanIN que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} pero estas lesiones no progresan seguramente a que tienen activo el mecanismo de senescencia (83).

Los ratones que expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} en la etapa adulta desarrollan lesiones preneoplásicas si son expuestos a episodios de pancreatitis, incluso cuando estos episodios son durante breves periodos de tiempo, 1 mes por ejemplo (39). Estas observaciones, hacen pensar que en humanos, al menos algunos de los PDAC pueden ser originados por pequeños incidentes de pancreatitis no diagnosticadas en individuos que presenten la mutación del oncogén *K-RAS*. Debido a que la identificación de las mutaciones de *K-RAS* en individuos sanos sería muy difícil y costoso, es necesario hacer un seguimiento detallado de los pacientes que han sido diagnosticados de pancreatitis crónica para evitar el desarrollo de lesiones PanIN, o si ya están presentes impedir que éstas progresen. Además, es importante encontrar biomarcadores que

puedan usarse para identificar individuos que hayan padecido pancreatitis asintomáticas, al menos en la población de mayor riesgo.

Para elucidar la importancia de la senescencia y la pancreatitis en el desarrollo tumoral, se analizaron biopsias pertenecientes a pacientes que presentaban PDAC. Las lesiones de bajo grado encontradas en las biopsias de los pacientes, expresaban marcadores de senescencia, mientras que ninguno de estos marcadores estaban presentes en el tumor. No obstante, la información más relevante relacionada con el desarrollo de PanIN y el fenómeno de senescencia provenía de las muestras de biopsias de pacientes con pancreatitis crónica. Aunque el número de las muestras no era muy grande, la correlación obtenida entre la expresión de senescencia y el tratamiento antiinflamatorio resultó ser concluyente. Así, sólo las lesiones PanIN de bajo grado de pacientes tratados con antiinflamatorios presentaban marcadores de senescencia. El resultado era independiente del tipo de tratamiento antiinflamatorio recibido, esteroideo o NSAID. Estos resultados son idénticos a los obtenidos con nuestro modelo de ratón. Por lo tanto, se puede concluir que, el tratamiento antiinflamatorio en pacientes que presentan pancreatitis crónica es beneficioso debido a que conserva el mecanismo de senescencia en las lesiones PanIN de bajo grado, tan importante para evitar que estas progresen a lesiones de mayor malignidad. Futuros estudios han de establecer la relevancia de estos tratamientos impidiendo o retrasando el desarrollo de PDAC.

La correlación entre la inflamación y la pérdida del mecanismo de senescencia inducido por oncogenes (OIS), también tiene importantes implicaciones para la prevención del desarrollo de PDAC. Como se ha dicho anteriormente el tratamiento con antiinflamatorios mantiene la expresión de los marcadores de senescencia en las lesiones PanIN de bajo grado presentes en los individuos diagnosticados de pancreatitis crónica. Recientemente, se han publicado diversos estudios epidemiológicos que proponen la existencia de una correlación beneficiosa entre los NSAID y el riesgo de padecer cáncer de páncreas (10), (11) y (132). Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que el tratamiento antiinflamatorio puede disminuir el riesgo de desarrollar PDAC, debido a que mantiene el mecanismo de senescencia en las etapas más tempranas del desarrollo tumoral, en las lesiones PanIN de bajo grado. Queda por determinar, el posible beneficio de la inhibición de la respuesta inflamatoria en los pacientes que presenten PDAC. Futuras investigaciones con nuestro modelo de ratón y el empleo de diferentes estrategias genéticas, ayudarán también a obtener esta información a nivel experimental.

7.2 Papel del Egfr en el desarrollo de tumores pancreáticos inducidos por el oncogén *K-Ras*^{G12V}.

7.2.1 La expresión de EGFR está presente en todos los estadios de la progresión tumoral de páncreas.

Se ha descrito el papel de EGFR en la patogénesis de numerosos tipos de tumores de origen epitelial (111). Como se ha explicado en la introducción la activación anómala del receptor en diversos tumores ocurre por: mutación del receptor, sobreexpresión de sus ligandos o de aquellas moléculas que activan los mismos, como las metaloproteinasas (ADAM), etc.

Observaciones clínicas en tumores de pulmón de célula no pequeña NSCLC, un tipo de tumor que presenta frecuentemente mutaciones de EGFR y de *K-RAS*, han indicado que ambas mutaciones son mutuamente excluyentes (142). Igualmente, en pacientes con cáncer colorrectal, la presencia de la mutación del oncogén *K-RAS* predice una mala respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales contra EGFR (82). Por otra parte, sólo aquellos pacientes que no presenten mutaciones en el oncogén *K-RAS*, se beneficiaran del tratamiento con inhibidores de *EGFR* (72).

Sin embargo, los tumores pancreáticos podrían ser una excepción al dogma. De hecho, aunque, las mutaciones de *EGFR* que se han encontrado representan un pequeño porcentaje (<3%), si pueden coexistir con mutaciones en el oncogén *K-RAS* (113). Por otro lado se ha descrito un aumento de la expresión de EGFR, sus ligandos y ADAM 17 (metaloproteinasa implicada en el proceso de corte y liberación del ectodominio de los ligandos de la familia de EGFR) en PDAC (130), en presencia del oncogén *K-RAS*. En líneas celulares procedentes de PDAC la señalización a través de EGFR promueve la proliferación celular e invasión incluso cuando K-Ras está mutado (174).

Para conocer un poco más la señalización de Egfr se realizaron estudios de expresión de los ligandos y de los demás receptores de la familia ErbB en células acinares, además de ensayos *in vitro* de transformación acino-ductal, con nuestro modelo de ratón, en respuesta a los ligandos de Egfr. En Los estudios de expresión realizados en células acinares procedentes del protocolo embrionario de ratones *ElasK-Ras*^{G12V};*Egfr*^{+/+} y *ElasK-Ras*^{G12V};*Egfr*^{lox/lox} se encontró un aumento en los niveles de expresión de EGF, TGF α y amphirregulina, en ambos genotipos. Ilegible!!! Sin embargo, cabe destacar que en el ratón *ElasK-Ras*^{G12V};*Egfr*^{lox/lox} existe un incremento en los ligandos EGF y TGF α y una disminución importante de amphirregulina respecto de los acinos que expresan *Egfr*. Podría ser debido un mecanismo de compensación ya que en ausencia de Egfr los ligandos que aumentan son los que se unen específicamente a este receptor, incrementando sus

niveles podrían intentar compensar la ausencia del receptor. En células acinares aisladas de ratones *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* además del incremento en los niveles de los ligandos EGF y TGF α , se observó un incremento en el receptor Her-3. Podría ser debido a un mecanismo de compensación en ausencia del Egfr, ya que Her-3 forma heterodímeros con todos los miembros de la familia de Receptor de Crecimiento Epidérmico. Sin embargo, como los niveles de expresión de las neurregulinas (ligandos que se unen específicamente a Her-3 y Her-4) son mínimos, casi inexistentes, en ausencia de Egfr, Her-3 no puede compensar la ausencia de Egfr y por tanto no tiene lugar el proceso de transdiferenciación acino-ductal, ni la progresión tumoral.

Los ensayos *in vitro* de transdiferenciación acino-ductal que se realizaron con nuestro modelo de ratón *ElasK-Ras^{G12V}*, corroboraron los resultados de los estudios *in vivo* (ver después). Así, en ausencia de Egfr las células acinares aisladas que expresaban el oncogén *K-Ras^{G12V}* mostraron una reducida capacidad de transdiferenciación incluso cuando se adicionaban al medio los ligandos del receptor, EGF o TGF α . En cambio, en presencia del receptor las células acinares daban lugar a la formación de estructuras de tipo ductal de forma dependiente de la cantidad de ligando adicionada al medio, ya que el número de estructuras de tipo ductal aumentaban proporcionalmente con la concentración de EGF o TGF α . Por lo que la señalización de Egfr es necesaria para que tenga lugar la transdiferenciación acino-ductal, y probablemente el aumento de los ligandos como EGF, TGF α y amphirregulina en las células acinares que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* promueven tanto un aumento de los niveles del receptor como de su señalización desde la formación de metaplasias, PanIN y PDAC. Futuros estudios podrán establecer esta hipótesis.

7.2.2 Egfr es esencial para el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC inducidas por la expresión del oncogén K-Ras tanto en el protocolo embrionario como en el adulto

Egfr se expresa en todos los tipos de lesiones desde las metaplasias, hasta las lesiones PanIN y los PDAC, tanto en nuestro modelo de ratón, como en muestras de pacientes. Además, la presencia de Egfr es necesaria para que se produzca la transdiferenciación acino-ductal *in vitro*. Por lo tanto, nos planteamos la importancia de la señalización de Egfr en la iniciación tumoral en páncreas, en presencia del oncogén *K-Ras^{G12V}*, mutación que aparece en un 90% de los PDAC. Para ello cruzamos nuestro modelo de ratón con el knockout condicional de Egfr y así poder evaluar el desarrollo de las lesiones de PanIN.

Los ratones con los alelos salvajes de *Egfr* de un año de edad que expresan el oncogén *K-Ras^{G12V}* desde estadios embrionarios desarrollaron un amplio espectro de lesiones, incluso un 23% de ellos desarrolló PDAC. Los ratones heterocigotos para la delección de *Egfr*, desarrollaron menos lesiones preneoplásicas de alto y bajo grado y sólo uno de diez ratones analizados

desarrolló PDAC. Con eliminación de los dos alelos de *Egfr* se consiguió un bloqueo completo en el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC en el protocolo embrionario. Incluso con dos años de edad ninguno de los ratones estudiados presentaron lesiones en ausencia de *Egfr*. Estos resultados son de gran importancia, porque indican que la inactivación de *Egfr* impide el desarrollo tumoral, al menos a nivel de iniciación.

Sin embargo, no podemos descartar que estos resultados sean consecuencia de expresar el oncogén *K-Ras*^{G12V} y la deleción de *Egfr* durante el desarrollo embrionario, pudiendo alterar la homeostasis del páncreas. Por ello, se decidió estudiar el papel de *Egfr* en un modelo, más fisiológico, es decir, más parecido a la situación que acontece en humanos, en el protocolo adulto. En este protocolo, los ratones expresan el oncogén *K-Ras*^{G12V} desde los dos meses de edad, momento en el que se les considera adultos, y son sometidos a un tratamiento diario de ceruleína para la inducción de la pancreatitis crónica, desde los 3 hasta los 6 meses de edad. Los ratones fueron analizados a los 14 meses de edad. Los animales que presentaban los alelos salvajes de *Egfr* desarrollaron lesiones PanIN de bajo grado, más del 90% desarrolló lesiones PanIN de alto grado y un 8% desarrolló PDAC. Los animales heterocigotos para *Egfr* presentaron una importante disminución de la media de lesiones por páncreas, aunque el porcentaje de ratones afectados por lesiones de diferentes grados fue muy parecido a los controles (80% presentaron lesiones PanIN y un 10% desarrolló PDAC). Por el contrario, aquellos ratones en los que la deleción de los dos alelos de *Egfr* se producía a la vez que la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} no desarrollaron ningún tipo de lesión PanIN, ni tampoco PDAC. Por lo tanto, la señalización de *Egfr* es necesaria para la iniciación de tumores pancreáticos inducidos por la expresión de *K-Ras*^{G12V}, tanto en el protocolo embrionario como en el adulto. En paralelo a nuestros estudios, resultados similares han sido descritos recientemente por otro grupo al deleciónar en estadios embrionarios tempranos (E10.5) *Egfr* en un modelo parecido de cáncer de páncreas inducido por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D}, *Ptfla*^{Cre/+}, *K-Ras*^{G12D}; *Egfr*^{lox/lox}. Estos ratones, al contrario que los controles, no desarrollaron metaplasias, ni lesiones de PanIN, ni PDAC a las diferentes edades estudiadas (4).

7.2.3 *Egfr* es esencial para el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC inducidas por la expresión del oncogén *K-Ras* en ausencia de p16/p19. En cambio, la pérdida de p53 provoca la activación de otras vías independientes de *Egfr*

La pérdida de expresión de los supresores tumorales *P16/P19* sucede en estadios intermedios de la progresión tumoral (PanIN1B y PanIN2), llegando a ser del 90% de los PDAC (17). En cambio, las mutaciones en *P53* suelen aparecer en las lesiones PanIN más avanzadas (PanIN3). El porcentaje de los PDAC que presenta inactivación de *P53* es del 50-70% (104).

Como *Egfr* es necesario para la iniciación de tumores pancreáticos inducidos por el oncogén *K-Ras*^{G12V}, nos planteamos estudiar la relevancia de *Egfr* en modelos más agresivos, en los que la ausencia de supresores tumores como *p16/p19* y *p53*, cooperan con el oncogén *K-Ras*^{G12V} en el desarrollo tumoral. Los GEMMs han permitido estudiar la cooperación del oncogén *K-Ras* con la pérdida de supresores tumorales como: *p53*, *p16*, *LKB1*, *Pten*, *Smad4* (119), resultando en un rápido desarrollo tumoral que en algunos casos se acompaña de metástasis. Los PDACs de cada uno de estos modelos de ratón muy probablemente emulan la biología tumoral de los diferentes pacientes. Por lo tanto, el uso de diferentes GEMMs ampliará nuestro conocimiento de la biología y de la genética tumoral y además, permitirá estudiar las diferentes respuestas terapéuticas de los diferentes tumores a determinados inhibidores. En esta tesis hemos realizado el primer estudio de este tipo, aplicando la misma estrategia terapéutica en dos modelos genéticos de PDAC diferentes, obteniendo además resultados muy diferentes.

Los ratones *ElasK-Ras*^{G12V};*p16/p19*^{lox/lox};*Egfr*^{lox/lox} de 1 año de edad, pertenecientes al protocolo prenatal, no presentaban ningún tipo de lesión, ni preneoplásica, ni PDAC. Por el contrario, los controles *ElasK-Ras*^{G12V};*p16/p19*^{lox/lox};*Egfr*^{+/+} desarrollaron diferente grado de lesiones (PanIN, PDAC y metástasis), que condujeron al sacrificio de los ratones debido a la gravedad de las lesiones. Para comprobar que la necesidad de *Egfr* en la iniciación tumoral en ausencia de *p16/p19* no era debido a problemas del desarrollo del páncreas, se realizó el mismo estudio en el protocolo adulto en presencia de ceruleína, obteniéndose los mismos resultados. Los animales que expresaban el oncogén *K-Ras*^{G12V} a partir de los dos meses de edad y a la vez tenían deleciónado *Egfr* y *p16/p19* no desarrollaron ningún tipo de lesión. Los animales control, hermanos de camada desarrollaron diferentes grados de lesiones y PDAC. Nuestros resultados indican que en ausencia de los supresores tumorales *p16/p19* la señalización de *Egfr* es esencial para el desarrollo de tumores. Por lo que cabría pensar que aquellos pacientes que presenten este tipo de mutaciones en sus tumores, podrían beneficiarse de un tratamiento con inhibidores de *Egfr*. Sin embargo, nuestros resultados aunque prometedores, son muy preliminares para pensar en trasladarlos a la clínica, ya que estos estudios se han centrado en la prevención, y no en la terapéutica, debido a las limitaciones genéticas del modelo.

En el protocolo prenatal, en presencia del oncogén *K-Ras*^{G12V} y en ausencia de *p53*, la deleción de *Egfr* no elimina por completo la aparición de tumores, pero incrementa la esperanza de vida en un 85% comparado con los controles. Resultados parecidos se obtienen en el protocolo adulto en presencia de ceruleína. En ausencia de *Egfr* se produce un retraso en la aparición de las lesiones, y las que se producen son de menor malignidad, pero en este caso la iniciación tumoral se produce por otras vías independientes de la señalización de *Egfr*.

Aunque estos estudios se han realizado a nivel de iniciación tumoral, los resultados sugieren que el tratamiento con inhibidores de EGFR podrían tener utilidad clínica (103), (110) y (120); especialmente en aquellos pacientes que mantengan intacta la expresión de *p53*. Nuestros resultados indican también un beneficio, aunque menor en aquellos tumores que tienen *p53* delecionado. En este tipo de tumores habrá que estudiar cuáles son las rutas alternativas que hacen a estos tumores independientes de la señalización de Egfr.

En paralelo a nuestros estudios, otro grupo ha descrito recientemente resultados similares al delecionar en estadios embrionarios tempranos (E10.5) *Egfr* en un modelo parecido de cáncer de páncreas, inducido por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D} en ausencia de *p53*: *K-Ras*^{LSL-G12D/+}; *Ptf1a*^{Cre/+}; *Trp53*^{fl/fl}. En ausencia de Egfr los ratones presentaban áreas de tejido normal en el páncreas aunque desarrollaban tumores y el 50% de éstos eran negativos para Egfr. Por el contrario, los ratones control, *K-Ras*^{G12D}; *p53*^{KO} presentaban PDAC en prácticamente, la totalidad del páncreas (4).

Nuestros resultados, junto con los del otro grupo, indican que los ensayos clínicos previamente realizados con inhibidores de EGFR, en los que se ha encontrado un beneficio parcial al tratamiento deberían revisarse y examinarse en función de las mutaciones presentes en los pacientes y principalmente, en base al estatus de *p53*.

Los estudios realizados hasta el momento se han centrado en las primeras etapas de la iniciación tumoral, ya que a la vez que se inicia la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}, se inicia la deleción de *Egfr*, independientemente del protocolo. En clínica esto sería inviable, ya que habría que iniciar un tratamiento preventivo, con inhibidores de EGFR en pacientes que presenten el oncogén *K-RAS*, que por otra parte sería muy difícil de determinar. El siguiente paso a realizar, sería el estudio de la importancia de EGFR como diana terapéutica: delecionar *Egfr* una vez que los ratones hayan desarrollado el tumor pancreático inducido por *K-Ras*^{G12V}. Este estudio genético se puede hacer modificando el modelo de ratón para usar dos enzimas recombinasas. Mediante la enzima Flp recombinasa controlaremos la expresión del knockin del oncogén *K-Ras*^{G12V} en las células acinares mediante el sistema Elas-tTA y Teto-Flpo. En los tumores de páncreas desarrollados se delecionará *Egfr* mediante la enzima Cre recombinasa. Para acelerar el desarrollo tumoral en los ratones incorporaremos los alelos *p53*^{flr/flr} que nos permitirá eliminar la expresión de este gen supresor de tumores a la vez que se expresa el oncogén *K-Ras*. Podemos mantener a los animales con tratamiento de doxiciclina hasta los dos meses de edad, en el momento de retirarla, se iniciará la expresión de la enzima Flp recombinasa y se expresará el oncogén *K-Ras*^{+G12V} y se inactivará *p53*. Desde los 3 hasta los 6 mese de edad a los ratones se les someterá a

un tratamiento diario de ceruleína para la inducción de la pancreatitis crónica indispensable en este protocolo para el desarrollo de lesiones. Se realizará el seguimiento del desarrollo tumoral por ecografía abdominal y en el momento en el que los tumores pancreáticos presenten unas dimensiones establecidas se procederá a la escisión de *Egfr* mediante la enzima Cre recombinasa cuya actividad será controlada mediante tratamiento intraperitoneal con 4-OHT.

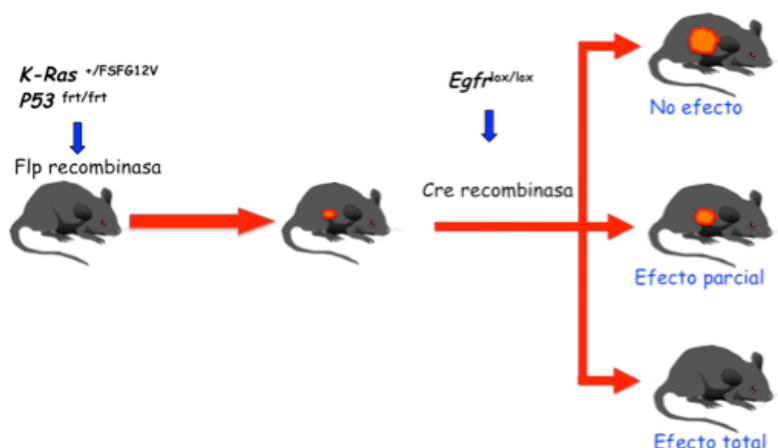


Figura 41: Representación esquemática de los posibles efectos que se pueden obtener con los protocolos de desarrollo tumoral. La expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V} y la delección de *p53* se consigue a través de la expresión de la recombinasa Flp que reconoce los sitios Frt que flanquean el casete stop casete de parada transcripcional insertado justo delante del exón 1, del alelo del gen *K-Ras*, que contiene la mutación en el codón 12 (G12V). Una vez se desarrolla el tumor se produce la delección de *Egfr* mediante la enzima Cre recombinasa obteniéndose los tres posibles efectos de esta delección en PDAC: ningún efecto, un efecto parcial con la reducción del tamaño tumoral o parada de crecimiento, o un efecto completo debido a la desaparición del tumor.

Dependiendo del efecto obtenido con estos protocolos del desarrollo tumoral (desaparición de los tumores, disminución del tamaño de los mismo o ningún efecto) sabremos si *Egfr* tiene la misma importancia para la iniciación que para el desarrollo tumoral (Figura 41). Este estudio podrá combinarse con estrategias farmacológicas y/o genéticas que puedan cooperar con la inhibición de *Egfr* en el tratamiento de tumores.

La diferencia de resultados entre los inhibidores de EGFR en clínica y el modelo genético de *Egfr* podrían también deberse a que en el primer caso estamos inhibiendo parcialmente la actividad quinasa y en el segundo estamos eliminado por completo la proteína. Para analizar esta posibilidad, además de los futuros estudios farmacológicos que realicemos en el modelo de ratón, en el laboratorio hemos desarrollado una nueva estrategia genética, un mutante de *Egfr* con la actividad quinasa inactiva. Esperamos conseguir con este modelo resultados más parecidos y comparables a los que se obtienen con inhibidores.

Durante el periodo de esta tesis no pudimos tratar con inhibidores a ratones con tumores establecidos, debido a que de momento no disponemos de estrategias (ni genéticas, ni farmacológicas) que eliminen la barrera que supone el estroma de los PDACs al tratamiento. Una de las características principales de los tumores de páncreas es la reacción desmoplásica, compuesta por fibroblastos y células inmunes que están embebidas dentro de una densa matriz extracelular, cuyo componente principal es el ácido hialurónico (AH), que podría tener un importante papel en la biología tumoral y en la resistencia de este tipo tumoral a la quimioterapia actual. Otra peculiaridad de los PDAC es la pobre vascularización que impide la difusión de la droga al interior del tumor (112). Los últimos estudios indican que para conseguir mejores resultados en el tratamiento de cáncer de páncreas sería necesario realizar una terapia combinada con estrategias dirigidas contra el tumor y contra el estroma. Así, el uso de inhibidores de la ruta Hedgehog (IPI-926) disminuye el estroma del tumor y aumenta la vascularización, mejorando la biodisponibilidad de la terapéutica convencional (Gemcitabina) en el modelo KPC (112). Otros estudios más recientes señalan que el uso combinado de agentes enzimáticos que degraden el AH como adyuvante de la quimioterapia puede prevenir o retrasar la aparición de metástasis (125). Además, se ha comprobado en GEMMs que este tipo de inhibidores, presenta un cierto sinergismo con la Gemcitabina, tratamiento habitual en los tumores de páncreas (64). Otra importante diana terapéutica para eliminar o reducir el componente desmoplásico del estroma es SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine, también conocido como osteo), proteína que se encuentra sobreexpresada en los CAF (Cancer Associated Fibroblast). SPARC es la diana terapéutica de la albúmina unida a Paclitaxel, conocido también como Abraxane, formulación novedosa de drogas citotóxicas que evita el uso de agentes tóxicos como vehículo (36). Se ha visto un efecto importante antitumoral con el uso de nab-paclitaxel junto con gemcitabina en un ensayo clínico de fase II, y ahora se está desarrollando el estudio de fase III (158). Estudios preclínicos realizados con tumores humanos en xenografts han sugerido que el mecanismo de acción de esta quimioterapia es por la unión de la albúmina a los fibroblastos que expresan SPARC (158). Por lo que en futuras investigaciones, se combinará el uso de inhibidores en nuestro modelo de ratón con estas u otras estrategias dirigidas contra el estroma.

Debido a las dificultades mencionadas de tratar ratones con tumores establecidos decidimos tratar con Erlotinib, inhibidor reversible del grupo tirosina quinasa de EGFR (66), a ratones *ElasK-Ras^{G12V}; p53^{lox/lox}* de 6 semanas, momento en el que los ratones presentan lesiones preneoplásicas y pequeños tumores. Los ratones control (aquellos que habían sido tratados con el vehículo) después de 4 semanas de tratamiento habían desarrollado un amplio número de lesiones de diferentes grados, incluso PDAC. En cambio, 4 de 14 animales tratados con Erlotinib. no desarrollaron ningún tipo de lesión, y otros 3 no desarrollaron PDAC. El resultado del tratamiento con el inhibidor de EGFR fue muy positivo porque no sólo llegó a reducir la aparición de lesiones

sino que incluso el 30% no desarrolló ningún tipo de lesión. En paralelo a nuestros estudios, otro grupo ha descrito recientemente resultados similares en un modelo parecido de cáncer de páncreas inducido por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D} en ausencia de p53 en estadios embrionarios tempranos (E10.5): *K-Ras*^{LSL-G12D/+}; *Ptfla*^{Cre/+}; *Trp53*^{fl/fl}. Estos ratones, que desarrollan PDAC invasivos a las 4-6 semanas de edad (6) fueron tratados con Cetuximab (anticuerpo monoclonal contra EGFR), Erlotinib (inhibidor de la región tirosina quinasa) o el vehículo desde la primera semana de edad, durante tres semanas. Obtuvieron un incremento de las áreas normales que no presentaban lesiones en el páncreas; por lo que al igual que nosotros, concluyen que Egfr tiene un papel importante al menos en la iniciación tumoral. Otros estudios también han descrito beneficio de este tratamiento. Así, el uso de inhibidores de EGFR en los modelos de xenografts de ratón frenan la progresión de las lesiones pancreáticas (110) y (29), al igual que en otro GEMM en el que las lesiones PanIN son inducidas por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12D} (100).

Sin embargo, los resultados positivos obtenidos por nuestro grupo y por otros grupos con el uso de inhibidores de Egfr en modelos animales (4), (100), (29), contrasta con el reducido beneficio que se obtiene al tratar pacientes con los inhibidores de EGFR en combinación con Gemcitabina (103). Esto se puede explicar en parte por las peculiaridades de los estudios realizados en modelos de ratón. Como sucede en nuestro caso, se trata de procedimientos durante la iniciación tumoral, es decir, se inicia el tratamiento al comienzo de la progresión tumoral. Y en el caso de los xenografts se añade el hecho de que las lesiones carecen del estroma típico de las lesiones. En clínica, los pacientes son diagnosticados de cáncer de páncreas en estado muy avanzado de la enfermedad, cuando el tumor presenta unas dimensiones considerables e incluso ya han desarrollado metástasis.

Finalmente, la posibilidad de generar explantes tumorales de ratones en ausencia de *p53* y *Egfr* nos ha permitido estudiar en mayor detalle el papel de Egfr en células tumorales establecidas, ya sean humanas o procedentes de los explantes tumorales de ratón. Los ensayos de silenciamiento genético con shRNA frente a Egfr o frente a sus principales efectores y los ensayos terapéuticos *in vitro* con inhibidores, nos han permitido testar la función de las principales dianas de las vías de señalización de EGFR.

Estos ensayos han demostrado el sinergismo entre la inhibición de la señalización a través de PI3K (mediante el tratamiento farmacológico) y de STAT3 (mediante el silenciamiento genético por shRNA). Estas observaciones sugieren que la pérdida de p53 puede reactivar las vías de señalización de PI3K/AKT y STAT3 por mecanismos independientes a EGFR en los tumores humanos. Otro indicio que nos hace suponer el importante papel de la vía de señalización

EGFR/PI3K/AKT en el desarrollo de tumores viene de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, que muestran que la eliminación de *Pten* (y por tanto la activación de AKT) en el modelo *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* permite el desarrollo tumoral en páncreas. En cambio, estos mismos grupos, obtuvieron resultados diferentes cuando trataron con Erlotinib explantes tumorales de ratones *K-Ras^{G12D};p53^{KO}*, viendo una reducción en los niveles de pErk (4). Los explantes de los tumores de estos ratones mostraban un aumento en la regulación de la vía de Notch y MET, dos importantes rutas de señalización implicadas en la tumorigénesis (97) (99). Aunque estas vías están aún por caracterizar en nuestros explantes, la diferencia de resultados con respecto a pERK y pAKT se puede deber a la diferente mutación presente en el oncogén *K-Ras*. Futuros estudios comparando diferencias estructurales y de señalización podrán ayudarnos a elucidar cómo se comportan ambas mutaciones a la hora de interaccionar con sus efectores.

Recientes observaciones respecto a la disminución tumoral con el uso de inhibidores de la señalización de Notch (121) y (25) pueden abrir la puerta al desarrollo de estrategias terapéuticas en combinación con inhibidores de PI3K y STAT3. Parece lógico pensar, debido a la complejidad de los tumores pancreáticos, que para conseguir la completa regresión de los mismos, será necesario inhibir diferentes vías de señalización, muchas de ellas aún por determinar. Por ello, se hace necesario descubrir vías de señalización adicionales o susceptibles de inhibición mediante tratamiento farmacológico. Como se ha comentado anteriormente, se puede destacar los recientes avances que se han hecho para eliminar la barrera del estroma que rodea a los tumores y que los hace impermeables para la mayoría de los tratamientos disponibles hoy en día en la clínica. Por lo que, en futuras investigaciones, en los modelos genéticamente modificados se podría combinar el uso de los inhibidores que se han utilizado en los ensayos *in vitro* de esta tesis junto con los inhibidores de AH, o de la ruta Hedgehog, etc., para lograr una mejora en la supervivencia de los pacientes.

En esta tesis se demuestra que la iniciación tumoral en páncreas inducida por la expresión del oncogén K-Ras en acinos, en presencia o en ausencia de pancreatitis, es totalmente dependiente de la señalización de EGFR. Este requerimiento se mantiene incluso en ausencia de los supresores tumorales como *p16/p19*, indicando que la necesidad de señalización a través de EGFR es más importante que la barrera de senescencia. Sin embargo, la eliminación de *p53* prevalece sobre este requerimiento. Sin embargo, cuando se delecta *Egfr*, las lesiones que se desarrollan en ausencia de *p53* son menores en número, tardan más tiempo en desarrollarse, y la supervivencia es mayor. Futuros trabajos de secuenciación de RNA nos permitirán conocer las rutas que tienen activadas aquellos tumores que crecen en ausencia de *p53* y de *Egfr*. Igualmente nuestros resultados indican que un estudio detallado de las mutaciones de los PDAC de los

pacientes podría ayudar a instaurar un tratamiento personalizado que resultaría más efectivo frente al tratamiento convencional que se usa actualmente en clínica.

Para determinar el papel de EGFR en las diferentes etapas de la progresión tumoral en páncreas, se realizó un estudio inmunohistoquímico detallado en muestras procedentes de autopsias humanas de páncreas normales, de pacientes con pancreatitis y cáncer de páncreas. En células acinares normales no se detectaron niveles de EGFR. Sin embargo, si se detectó la expresión de EGFR en la membrana de las células acinares de pacientes diagnosticados de pancreatitis crónica. Y dicha expresión se mantiene elevada desde las primeras etapas preneoplásicas hasta el desarrollo de tumores. En glándulas poco diferenciadas de tumores más avanzados, se pudo ver la pérdida de localización de la expresión de EGFR pasando de la membrana celular al citoplasma. Característica que se ha descrito previamente en muestras humanas y que lo relacionan con una disminución en la supervivencia del paciente y por tanto, peor pronóstico (153).

Conclusiones

8.- Conclusiones

- 1.- La pancreatitis contribuye al desarrollo de lesiones PanIN debido a la inhibición del fenómeno de senescencia.
- 2.- El tratamiento con antiinflamatorios retrasa la aparición de lesiones provocadas por la pancreatitis y revierte la senescencia.
- 3.- La transdiferenciación acino-ductal en presencia del oncogén *K-Ras*^{G12V} requiere la señalización a través de Egfr.
- 4.- Egfr es esencial para la formación de PanIN y PDAC inducidas por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}, en el modelo embrionario y el adulto en presencia de pancreatitis.
- 5.- Egfr coopera con el oncogén K-Ras activando la vía de señalización de Akt y Stat3.
- 6.- Egfr no es esencial para la formación de lesiones tumorales en intestino ni en pulmón inducidas por la expresión del oncogén *K-Ras*^{G12V}.
- 7.- La pérdida de senescencia no anula la necesidad de la señalización a través de Egfr durante el desarrollo de lesiones PanIN y PDAC.
- 8.- El tratamiento con Erlotinib interfiere en el desarrollo de PDAC in vivo en ratones *ElasK-Ras*^{G12V}; *p53*^{lox/lox}.
- 9.- La señalización de Egfr es necesaria para la proliferación de los explantes tumorales procedentes de PDAC de ratón.

Bibliografía

1. **Aguirre, A. J., N. Bardeesy, M. Sinha, L. Lopez, D. A. Tuveson, J. Horner, M. S. Redston, and R. A. DePinho.** 2003. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* **17**:3112-26.
2. **Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim, and M. Perucho.** 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**:549-54.
3. **Apelqvist, A., H. Li, L. Sommer, P. Beatus, D. J. Anderson, T. Honjo, M. Hrabe de Angelis, U. Lendahl, and H. Edlund.** 1999. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**:877-81.
4. **Ardito, C. M., B. M. Gruner, K. K. Takeuchi, C. Lubeseder-Martellato, N. Teichmann, P. K. Mazur, K. E. Delgiorno, E. S. Carpenter, C. J. Halbrook, J. C. Hall, D. Pal, T. Briel, A. Herner, M. Trajkovic-Arsic, B. Sipos, G. Y. Liou, P. Storz, N. R. Murray, D. W. Threadgill, M. Sibilio, M. K. Washington, C. L. Wilson, R. M. Schmid, E. W. Raines, H. C. Crawford, and J. T. Siveke.** 2012. EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* **22**:304-17.
5. **Auguste, P., S. Javerzat, and A. Bikfalvi.** 2003. Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* **314**:157-66.
6. **Bardeesy, N., A. J. Aguirre, G. C. Chu, K. H. Cheng, L. V. Lopez, A. F. Hezel, B. Feng, C. Brennan, R. Weissleder, U. Mahmood, D. Hanahan, M. S. Redston, L. Chin, and R. A. Depinho.** 2006. Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5947-52.
7. **Bardeesy, N., K. H. Cheng, J. H. Berger, G. C. Chu, J. Pahler, P. Olson, A. F. Hezel, J. Horner, G. Y. Lauwers, D. Hanahan, and R. A. DePinho.** 2006. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* **20**:3130-46.
8. **Bardeesy, N., and R. A. DePinho.** 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* **2**:897-909.
9. **Bardeesy, N., J. Morgan, M. Sinha, S. Signoretti, S. Srivastava, M. Loda, G. Merlino, and R. A. DePinho.** 2002. Obligate roles for p16(Ink4a) and p19(Arf)-p53 in the suppression of murine pancreatic neoplasia. *Mol Cell Biol* **22**:635-43.

10. **Bonifazi, M., S. Gallus, C. Bosetti, J. Polesel, D. Serraino, R. Talamini, E. Negri, and C. La Vecchia.** 2010. Aspirin use and pancreatic cancer risk. *Eur J Cancer Prev* **19**:352-4.
11. **Bradley, M. C., C. M. Hughes, M. M. Cantwell, G. Napolitano, and L. J. Murray.** 2010. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pancreatic cancer risk: a nested case-control study. *Br J Cancer* **102**:1415-21.
12. **Brembeck, F. H., F. S. Schreiber, T. B. Deramaudt, L. Craig, B. Rhoades, G. Swain, P. Grippo, D. A. Stoffers, D. G. Silberg, and A. K. Rustgi.** 2003. The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res* **63**:2005-9.
13. **Brocard, J., X. Warot, O. Wendling, N. Messaddeq, J. L. Vonesch, P. Chambon, and D. Metzger.** 1997. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14559-63.
14. **Brune, K., T. Abe, M. Canto, L. O'Malley, A. P. Klein, A. Maitra, N. Volkan Adsay, E. K. Fishman, J. L. Cameron, C. J. Yeo, S. E. Kern, M. Goggins, and R. H. Hruban.** 2006. Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. *Am J Surg Pathol* **30**:1067-76.
15. **Burgess, A. W., H. S. Cho, C. Eigenbrot, K. M. Ferguson, T. P. Garrett, D. J. Leahy, M. A. Lemmon, M. X. Sliwkowski, C. W. Ward, and S. Yokoyama.** 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* **12**:541-52.
16. **Bykov, V. J., G. Selivanova, and K. G. Wiman.** 2003. Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer* **39**:1828-34.
17. **Caldas, C., S. A. Hahn, L. T. da Costa, M. S. Redston, M. Schutte, A. B. Seymour, C. L. Weinstein, R. H. Hruban, C. J. Yeo, and S. E. Kern.** 1994. Frequent somatic

- mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* **8**:27-32.
18. **Caldas, C., and S. E. Kern.** 1995. K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* **18**:1-6.
 19. **Calhoun, E. S., J. B. Jones, R. Ashfaq, V. Adsay, S. J. Baker, V. Valentine, P. M. Hempen, W. Hilgers, C. J. Yeo, R. H. Hruban, and S. E. Kern.** 2003. BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets. *Am J Pathol* **163**:1255-60.
 20. **Canto, M. I., M. Goggins, R. H. Hruban, G. M. Petersen, F. M. Giardiello, C. Yeo, E. K. Fishman, K. Brune, J. Axilbund, C. Griffin, S. Ali, J. Richman, S. Jagannath, S. V. Kantsevov, and A. N. Kalloo.** 2006. Screening for early pancreatic neoplasia in high-risk individuals: a prospective controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**:766-81; quiz 665.
 21. **Carnero, A., C. Blanco-Aparicio, O. Renner, W. Link, and J. F. Leal.** 2008. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* **8**:187-98.
 22. **Collado, M.** 2010. Exploring a 'pro-senescence' approach for prostate cancer therapy by targeting PTEN. *Future Oncol* **6**:687-9.
 23. **Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Barbacid, D. Beach, and M. Serrano.** 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**:642.
 24. **Collisson, E. A., A. Sadanandam, P. Olson, W. J. Gibb, M. Truitt, S. Gu, J. Cooc, J. Weinkle, G. E. Kim, L. Jakkula, H. S. Feiler, A. H. Ko, A. B. Olshen, K. L. Danenberg, M. A. Tempero, P. T. Spellman, D. Hanahan, and J. W. Gray.** 2011. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* **17**:500-3.
 25. **Cook, N., K. K. Frese, T. E. Bapiro, M. A. Jacobetz, A. Gopinathan, J. L. Miller, S. S. Rao, T. Demuth, W. J. Howat, D. I. Jodrell, and D. A. Tuveson.** 2012. Gamma

- secretase inhibition promotes hypoxic necrosis in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Exp Med* **209**:437-44.
26. **Corcoran, R. B., G. Contino, V. Deshpande, A. Tzatsos, C. Conrad, C. H. Benes, D. E. Levy, J. Settleman, J. A. Engelman, and N. Bardeesy.** 2011. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res* **71**:5020-9.
 27. **De La, O. J., L. L. Emerson, J. L. Goodman, S. C. Froebe, B. E. Illum, A. B. Curtis, and L. C. Murtaugh.** 2008. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:18907-12.
 28. **Douziech, N., A. Lajas, Z. Coulombe, E. Calvo, J. Laine, and J. Morisset.** 1998. Growth effects of regulatory peptides and intracellular signaling routes in human pancreatic cancer cell lines. *Endocrine* **9**:171-83.
 29. **Durkin, A. J., D. A. Osborne, T. J. Yeatman, A. S. Rosemurgy, C. Armstrong, and E. E. Zervos.** 2006. EGF receptor antagonism improves survival in a murine model of pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Res* **135**:195-201.
 30. **Eser, S., N. Reiff, M. Messer, B. Seidler, K. Gottschalk, M. Dobler, M. Hieber, A. Arbeiter, S. Klein, B. Kong, C. W. Michalski, A. M. Schlitter, I. Esposito, A. J. Kind, L. Rad, A. E. Schnieke, M. Baccarini, D. R. Alessi, R. Rad, R. M. Schmid, G. Schneider, and D. Saur.** 2013. Selective Requirement of PI3K/PDK1 Signaling for Kras Oncogene-Driven Pancreatic Cell Plasticity and Cancer. *Cancer Cell* **23**:406-20.
 31. **Fischer, O. M., S. Hart, A. Gschwind, and A. Ullrich.** 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* **31**:1203-8.
 32. **Fukuda, A., S. C. Wang, J. P. t. Morris, A. E. Folias, A. Liou, G. E. Kim, S. Akira, K. M. Boucher, M. A. Firpo, S. J. Mulvihill, and M. Hebrok.** 2011. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer Cell* **19**:441-55.

33. **Garcea, G., C. P. Neal, C. J. Pattenden, W. P. Steward, and D. P. Berry.** 2005. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* **41**:2213-36.
34. **Ghaneh, P., A. Kawesha, J. D. Evans, and J. P. Neoptolemos.** 2002. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **9**:1-11.
35. **Gidekel Friedlander, S. Y., G. C. Chu, E. L. Snyder, N. Girnius, G. Dibelius, D. Crowley, E. Vasile, R. A. DePinho, and T. Jacks.** 2009. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* **16**:379-89.
36. **Gradishar, W. J.** 2006. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother* **7**:1041-53.
37. **Grunwald, V., and M. Hidalgo.** 2003. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* **95**:851-67.
38. **Guerra, C., and M. Barbacid.** 2013. Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Oncol* **7**:232-47.
39. **Guerra, C., M. Collado, C. Navas, A. J. Schuhmacher, I. Hernandez-Porras, M. Canamero, M. Rodriguez-Justo, M. Serrano, and M. Barbacid.** 2011. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **19**:728-39.
40. **Guerra, C., N. Mijimolle, A. Dhawahir, P. Dubus, M. Barradas, M. Serrano, V. Campuzano, and M. Barbacid.** 2003. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* **4**:111-20.
41. **Guerra, C., A. J. Schuhmacher, M. Canamero, P. J. Grippo, L. Verdaguer, L. Perez-Gallego, P. Dubus, E. P. Sandgren, and M. Barbacid.** 2007. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* **11**:291-302.
42. **Guo, W., and F. G. Giancotti.** 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:816-26.

43. **Hahn, S. A., M. Schutte, A. T. Hoque, C. A. Moskaluk, L. T. da Costa, E. Rozenblum, C. L. Weinstein, A. Fischer, C. J. Yeo, R. H. Hruban, and S. E. Kern.** 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* **271**:350-3.
44. **Halilovic, E., Q. B. She, Q. Ye, R. Pagliarini, W. R. Sellers, D. B. Solit, and N. Rosen.** 2010. PIK3CA mutation uncouples tumor growth and cyclin D1 regulation from MEK/ERK and mutant KRAS signaling. *Cancer Res* **70**:6804-14.
45. **Hanlon, L., J. L. Avila, R. M. Demarest, S. Troutman, M. Allen, F. Ratti, A. K. Rustgi, B. Z. Stanger, F. Radtke, V. Adsay, F. Long, A. J. Capobianco, and J. L. Kissil.** 2010. Notch1 functions as a tumor suppressor in a model of K-ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* **70**:4280-6.
46. **Haslekas, C., K. Breen, K. W. Pedersen, L. E. Johannessen, E. Stang, and I. H. Madshus.** 2005. The inhibitory effect of ErbB2 on epidermal growth factor-induced formation of clathrin-coated pits correlates with retention of epidermal growth factor receptor-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* **16**:5832-42.
47. **Hidalgo, L., A. Repiso, M. Romero, J. Navajas, R. Sanchez-Simon, R. Gomez-Rodriguez, and J. M. Carrobbles.** 2010. Obstructive jaundice as a complication of a peptic duodenal ulcer mimicking pancreatic cancer. *Endoscopy* **42 Suppl 2**:E294-5.
48. **Hidalgo, M.** 2012. New insights into pancreatic cancer biology. *Ann Oncol* **23 Suppl 10**:x135-8.
49. **Hidalgo, M., L. L. Siu, J. Nemunaitis, J. Rizzo, L. A. Hammond, C. Takimoto, S. G. Eckhardt, A. Tolcher, C. D. Britten, L. Denis, K. Ferrante, D. D. Von Hoff, S. Silberman, and E. K. Rowinsky.** 2001. Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* **19**:3267-79.

50. **Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. A. Jacobetz, S. Ross, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, B. A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L. A. Liotta, H. C. Crawford, M. E. Putt, T. Jacks, C. V. Wright, R. H. Hruban, A. M. Lowy, and D. A. Tuveson.** 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**:437-50.
51. **Hingorani, S. R., and D. A. Tuveson.** 2003. Ras redux: rethinking how and where Ras acts. *Curr Opin Genet Dev* **13**:6-13.
52. **Hingorani, S. R., L. Wang, A. S. Multani, C. Combs, T. B. Deramaudt, R. H. Hruban, A. K. Rustgi, S. Chang, and D. A. Tuveson.** 2005. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**:469-83.
53. **Hong, S. M., C. M. Heaphy, C. Shi, S. H. Eo, H. Cho, A. K. Meeker, J. R. Eshleman, R. H. Hruban, and M. Goggins.** 2011. Telomeres are shortened in acinar-to-ductal metaplasia lesions associated with pancreatic intraepithelial neoplasia but not in isolated acinar-to-ductal metaplasias. *Mod Pathol* **24**:256-66.
54. **Hong, S. M., J. Y. Park, R. H. Hruban, and M. Goggins.** 2011. Molecular signatures of pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* **135**:716-27.
55. **Houbracken, I., E. de Waele, J. Lardon, Z. Ling, H. Heimberg, I. Rooman, and L. Bouwens.** 2011. Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas. *Gastroenterology* **141**:731-41, 741 e1-4.
56. **Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons, and S. E. Kern.** 2000. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **6**:2969-72.
57. **Hruban, R. H., A. Maitra, S. E. Kern, and M. Goggins.** 2007. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **36**:831-49, vi.
58. **Hruban, R. H., A. Maitra, R. Schulick, D. Laheru, J. Herman, S. E. Kern, and M. Goggins.** 2008. Emerging molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer Res* **2**:S10-5.

59. **Hruban, R. H., K. Takaori, D. S. Klimstra, N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, A. V. Biankin, S. A. Biankin, C. Compton, N. Fukushima, T. Furukawa, M. Goggins, Y. Kato, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G. J. Offerhaus, M. Shimizu, and S. Yonezawa.** 2004. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* **28**:977-87.
60. **Hruban, R. H., R. E. Wilentz, and S. E. Kern.** 2000. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* **156**:1821-5.
61. **Huang, C., R. Huang, W. Chang, T. Jiang, K. Huang, J. Cao, X. Sun, and Z. Qiu.** 2012. The expression and clinical significance of pSTAT3, VEGF and VEGF-C in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasma* **59**:52-61.
62. **Huang, S., and F. A. Sinicrope.** 2010. Sorafenib inhibits STAT3 activation to enhance TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* **9**:742-50.
63. **Izeradjene, K., C. Combs, M. Best, A. Gopinathan, A. Wagner, W. M. Grady, C. X. Deng, R. H. Hruban, N. V. Adsay, D. A. Tuveson, and S. R. Hingorani.** 2007. Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell* **11**:229-43.
64. **Jacobetz, M. A., D. S. Chan, A. Neesse, T. E. Bapiro, N. Cook, K. K. Frese, C. Feig, T. Nakagawa, M. E. Caldwell, H. I. Zecchini, M. P. Lolkema, P. Jiang, A. Kultti, C. B. Thompson, D. C. Maneval, D. I. Jodrell, G. I. Frost, H. M. Shepard, J. N. Skepper, and D. A. Tuveson.** 2013. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* **62**:112-20.
65. **Jimeno, A., and M. Hidalgo.** 2006. Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* **5**:787-96.
66. **Jimeno, A., and M. Hidalgo.** 2006. Pharmacogenomics of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1766**:217-29.

67. **Jones, S., X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S. M. Hong, B. Fu, M. T. Lin, E. S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D. R. Smith, M. Hidalgo, S. D. Leach, A. P. Klein, E. M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J. R. Eshleman, S. E. Kern, R. H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, and K. W. Kinzler.** 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**:1801-6.
68. **Jonkers, J., R. Meuwissen, H. van der Gulden, H. Peterse, M. van der Valk, and A. Berns.** 2001. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* **29**:418-25.
69. **Jorissen, R. N., H. R. Treutlein, V. C. Epa, and A. W. Burgess.** 2002. Modeling the epidermal growth factor -- epidermal growth factor receptor 12 domain interaction: implications for the ligand binding process. *J Biomol Struct Dyn* **19**:961-72.
70. **Joseph, E. W., C. A. Pratilas, P. I. Poulikakos, M. Tadi, W. Wang, B. S. Taylor, E. Halilovic, Y. Persaud, F. Xing, A. Viale, J. Tsai, P. B. Chapman, G. Bollag, D. B. Solit, and N. Rosen.** 2010. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:14903-8.
71. **Jura, N., H. Archer, and D. Bar-Sagi.** 2005. Chronic pancreatitis, pancreatic adenocarcinoma and the black box in-between. *Cell Res* **15**:72-7.
72. **Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, D. J. Jonker, C. J. O'Callaghan, D. Tu, N. C. Tebbutt, R. J. Simes, H. Chalchal, J. D. Shapiro, S. Robitaille, T. J. Price, L. Shepherd, H. J. Au, C. Langer, M. J. Moore, and J. R. Zalberg.** 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* **359**:1757-65.
73. **Kelley, R. K., and A. H. Ko.** 2008. Erlotinib in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Biologics* **2**:83-95.

74. **Klapper, L. N., M. H. Kirschbaum, M. Sela, and Y. Yarden.** 2000. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* **77**:25-79.
75. **Kopp, J. L., G. von Figura, E. Mayes, F. F. Liu, C. L. Dubois, J. P. t. Morris, F. C. Pan, H. Akiyama, C. V. Wright, K. Jensen, M. Hebrok, and M. Sander.** 2012. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**:737-50.
76. **Korc, M., B. Chandrasekar, Y. Yamanaka, H. Friess, M. Buchler, and H. G. Beger.** 1992. Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* **90**:1352-60.
77. **Krimpenfort, P., K. C. Quon, W. J. Mooi, A. Loonstra, and A. Berns.** 2001. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* **413**:83-6.
78. **Kuniyasu, H., L. M. Ellis, D. B. Evans, J. L. Abbruzzese, C. J. Fenoglio, C. D. Bucana, K. R. Cleary, E. Tahara, and I. J. Fidler.** 1999. Relative expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts disease outcome in patients with resectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* **5**:25-33.
79. **Kuwahara, K., T. Sasaki, Y. Kuwada, M. Murakami, S. Yamasaki, and K. Chayama.** 2003. Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas* **26**:344-9.
80. **Lee, J. C., S. B. Smith, H. Watada, J. Lin, D. Scheel, J. Wang, R. G. Mirmira, and M. S. German.** 2001. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* **50**:928-36.
81. **Lesina, M., M. U. Kurkowski, K. Ludes, S. Rose-John, M. Treiber, G. Kloppel, A. Yoshimura, W. Reindl, B. Sipos, S. Akira, R. M. Schmid, and H. Algul.** 2011. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* **19**:456-69.

82. **Lievre, A., J. B. Bachet, D. Le Corre, V. Boige, B. Landi, J. F. Emile, J. F. Cote, G. Tomasic, C. Penna, M. Ducreux, P. Rougier, F. Penault-Llorca, and P. Laurent-Puig.** 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* **66**:3992-5.
83. **Lohr, M., P. Maisonneuve, and A. B. Lowenfels.** 2000. K-Ras mutations and benign pancreatic disease. *Int J Pancreatol* **27**:93-103.
84. **Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg, and L. Domellof.** 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* **328**:1433-7.
85. **Lynch, T. J., D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Christiani, J. Settleman, and D. A. Haber.** 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350**:2129-39.
86. **Ma, J., H. Sawai, N. Ochi, Y. Matsuo, D. Xu, A. Yasuda, H. Takahashi, T. Wakasugi, and H. Takeyama.** 2009. PTEN regulates angiogenesis through PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in human pancreatic cancer cells. *Mol Cell Biochem* **331**:161-71.
87. **Maisonneuve, P., and A. B. Lowenfels.** 2002. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis* **20**:32-7.
88. **Maitra, A., N. Fukushima, K. Takaori, and R. H. Hruban.** 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* **12**:81-91.
89. **Maitra, A., and R. H. Hruban.** 2005. A new mouse model of pancreatic cancer: PTEN gets its Akt together. *Cancer Cell* **8**:171-2.
90. **Maitra, A., and R. H. Hruban.** 2008. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* **3**:157-88.
91. **Maitra, A., S. E. Kern, and R. H. Hruban.** 2006. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **20**:211-26.

92. **Malka, D., P. Hammel, F. Maire, P. Rufat, I. Madeira, F. Pessione, P. Levy, and P. Ruszniewski.** 2002. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* **51**:849-52.
93. **Marshall, J.** 2006. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer* **107**:1207-18.
94. **Martinez Gonzalez, S., A. I. Hernandez, C. Varela, M. Lorenzo, F. Ramos-Lima, E. Cendon, D. Cebrian, E. Aguirre, E. Gomez-Casero, M. I. Albarran, P. Alfonso, B. Garcia-Serelde, G. Mateos, J. Oyarzabal, O. Rabal, F. Mulero, T. Gonzalez-Granda, W. Link, J. Fominaya, M. Barbacid, J. R. Bischoff, P. Pizcueta, C. Blanco-Aparicio, and J. Pastor.** 2012. Rapid identification of ETP-46992, orally bioavailable PI3K inhibitor, selective versus mTOR. *Bioorg Med Chem Lett* **22**:5208-14.
95. **Mazur, P. K., B. M. Gruner, H. Nakhai, B. Sipos, U. Zimmer-Strobl, L. J. Strobl, F. Radtke, R. M. Schmid, and J. T. Siveke.** 2010. Identification of epidermal Pdx1 expression discloses different roles of Notch1 and Notch2 in murine Kras(G12D)-induced skin carcinogenesis in vivo. *PLoS One* **5**:e13578.
96. **Mazur, P. K., and J. T. Siveke.** 2012. Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut* **61**:1488-500.
97. **Means, A. L., I. M. Meszoely, K. Suzuki, Y. Miyamoto, A. K. Rustgi, R. J. Coffey, Jr., C. V. Wright, D. A. Stoffers, and S. D. Leach.** 2005. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* **132**:3767-76.
98. **Meeker, A. K., and A. M. De Marzo.** 2004. Recent advances in telomere biology: implications for human cancer. *Curr Opin Oncol* **16**:32-8.
99. **Miyamoto, Y., A. Maitra, B. Ghosh, U. Zechner, P. Argani, C. A. Iacobuzio-Donahue, V. Sriuranpong, T. Iso, I. M. Meszoely, M. S. Wolfe, R. H. Hruban, D. W. Ball, R. M. Schmid, and S. D. Leach.** 2003. Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* **3**:565-76.

100. **Mohammed, A., N. B. Janakiram, Q. Li, V. Madka, M. Ely, S. Lightfoot, H. Crawford, V. E. Steele, and C. V. Rao.** 2010. The epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib prevents the progression of pancreatic lesions to carcinoma in a conditional LSL-KrasG12D/+ transgenic mouse model. *Cancer Prev Res (Phila)* **3**:1417-26.
101. **Molina, J. R., and A. A. Adjei.** 2006. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol* **1**:7-9.
102. **Momi, N., S. Kaur, S. R. Krishn, and S. K. Batra.** 2012. Discovering the route from inflammation to pancreatic cancer. *Minerva Gastroenterol Dietol* **58**:283-97.
103. **Moore, M. J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, H. J. Au, P. Murawa, D. Walde, R. A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski, and W. Parulekar.** 2007. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* **25**:1960-6.
104. **Moore, P. S., B. Sipos, S. Orlandini, C. Sorio, F. X. Real, N. R. Lemoine, T. Gress, C. Bassi, G. Kloppel, H. Kalthoff, H. Ungefroren, M. Lohr, and A. Scarpa.** 2001. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* **439**:798-802.
105. **Morris, J. P. t., D. A. Cano, S. Sekine, S. C. Wang, and M. Hebrok.** 2010. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest* **120**:508-20.
106. **Nakamura, H., S. Horita, N. Senmaru, Y. Miyasaka, T. Gohda, Y. Inoue, M. Fujita, T. Meguro, T. Morita, and K. Nagashima.** 2002. Association of matrilysin expression with progression and poor prognosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncol Rep* **9**:751-5.
107. **Natarajan, A., B. Wagner, and M. Sibilica.** 2007. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:17081-6.

108. **Navas, C., I. Hernandez-Porras, A. J. Schuhmacher, M. Sibilia, C. Guerra, and M. Barbacid.** 2012. EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**:318-30.

109. **Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J. A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr, and M. W. Buchler.** 2004. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* **350**:1200-10.

110. **Ng, S. S., M. S. Tsao, T. Nicklee, and D. W. Hedley.** 2002. Effects of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774, Tarceva, on downstream signaling pathways and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* **1**:777-83.

111. **Normanno, N., A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro, and D. S. Salomon.** 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**:2-16.

112. **Olive, K. P., M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M. A. Goldgraben, M. E. Caldwell, D. Allard, K. K. Frese, G. Denicola, C. Feig, C. Combs, S. P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W. J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Ruckert, R. Grutzmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S. R. Hingorani, P. Huang, S. E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R. H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths, and D. A. Tuveson.** 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* **324**:1457-61.

113. **Oliveira-Cunha, M., K. D. Hadfield, A. K. Siriwardena, and W. Newman.** 2012. EGFR and KRAS mutational analysis and their correlation to survival in pancreatic and periampullary cancer. *Pancreas* **41**:428-34.

114. **Osaki, A., M. Toi, H. Yamada, H. Kawami, K. Kuroi, and T. Toge.** 1992. Prognostic significance of co-expression of c-erbB-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in breast cancer patients. *Am J Surg* **164**:323-6.

115. **Ottenhof, N. A., R. F. de Wilde, A. Maitra, R. H. Hruban, and G. J. Offerhaus.** 2011. Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Patholog Res Int* **2011**:620601.
116. **Ouyang, X., T. Gulliford, G. Huang, and R. J. Epstein.** 1999. Transforming growth factor-alpha short-circuits downregulation of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Physiol* **179**:52-7.
117. **Paramythiotis, D., J. Kleeff, J. Schmidt, M. W. Buchler, and H. Friess.** 2003. Detection of oncogenes in chronic pancreatitis. *HPB (Oxford)* **5**:214-25.
118. **Parsa, I., D. S. Longnecker, D. G. Scarpelli, P. Pour, J. K. Reddy, and M. Lefkowitz.** 1985. Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma. *Cancer Res* **45**:1285-90.
119. **Perez-Mancera, P. A., C. Guerra, M. Barbacid, and D. A. Tuveson.** 2012. What we have learned about pancreatic cancer from mouse models. *Gastroenterology* **142**:1079-92.
120. **Philip, P. A., J. Benedetti, C. L. Corless, R. Wong, E. M. O'Reilly, P. J. Flynn, K. M. Rowland, J. N. Atkins, B. C. Mirtsching, S. E. Rivkin, A. A. Khorana, B. Goldman, C. M. Fenoglio-Preiser, J. L. Abbruzzese, and C. D. Blanke.** 2010. Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. *J Clin Oncol* **28**:3605-10.
121. **Plentz, R., J. S. Park, A. D. Rhim, D. Abravanel, A. F. Hezel, S. V. Sharma, S. Gurumurthy, V. Deshpande, C. Kenific, J. Settleman, P. K. Majumder, B. Z. Stanger, and N. Bardeesy.** 2009. Inhibition of gamma-secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* **136**:1741-9 e6.

122. **Pollack, V. A., D. M. Savage, D. A. Baker, K. E. Tsaparikos, D. E. Sloan, J. D. Moyer, E. G. Barbacci, L. R. Pustilnik, T. A. Smolarek, J. A. Davis, M. P. Vaidya, L. D. Arnold, J. L. Doty, K. K. Iwata, and M. J. Morin.** 1999. Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:739-48.
123. **Prasad, N. B., A. V. Biankin, N. Fukushima, A. Maitra, S. Dhara, A. G. Elkahloun, R. H. Hruban, M. Goggins, and S. D. Leach.** 2005. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res* **65**:1619-26.
124. **Prenzel, N., E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham, C. Wallasch, and A. Ullrich.** 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**:884-8.
125. **Provenzano, P. P., C. Cuevas, A. E. Chang, V. K. Goel, D. D. Von Hoff, and S. R. Hingorani.** 2012. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21**:418-29.
126. **Puyol, M., A. Martin, P. Dubus, F. Mulero, P. Pizcueta, G. Khan, C. Guerra, D. Santamaria, and M. Barbacid.** 2010. A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* **18**:63-73.
127. **Qiu, W., and G. H. Su.** 2012. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*
128. **Raimondi, S., P. Maisonneuve, and A. B. Lowenfels.** 2009. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**:699-708.
129. **Redston, M. S., C. Caldas, A. B. Seymour, R. H. Hruban, L. da Costa, C. J. Yeo, and S. E. Kern.** 1994. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* **54**:3025-33.
130. **Ringel, J., R. Jesnowski, N. Moniaux, J. Luttges, A. Choudhury, S. K. Batra, G. Kloppel, and M. Lohr.** 2006. Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase

- 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* **66**:9045-53.
131. **Roskoski, R., Jr.** 2004. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **319**:1-11.
 132. **Rothwell, P. M., F. G. Fowkes, J. F. Belch, H. Ogawa, C. P. Warlow, and T. W. Meade.** 2011. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* **377**:31-41.
 133. **Roy, S. K., R. K. Srivastava, and S. Shankar.** 2010. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J Mol Signal* **5**:10.
 134. **Sansom, O. J., V. Meniel, J. A. Wilkins, A. M. Cole, K. A. Oien, V. Marsh, T. J. Jamieson, C. Guerra, G. H. Ashton, M. Barbacid, and A. R. Clarke.** 2006. Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14122-7.
 135. **Sato, N., T. Ueki, N. Fukushima, C. A. Iacobuzio-Donahue, C. J. Yeo, J. L. Cameron, R. H. Hruban, and M. Goggins.** 2002. Aberrant methylation of CpG islands in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* **123**:365-72.
 136. **Schonleben, F., W. Qiu, N. T. Ciau, D. J. Ho, X. Li, J. D. Allendorf, H. E. Remotti, and G. H. Su.** 2006. PIK3CA mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* **12**:3851-5.
 137. **Seshacharyulu, P., M. P. Ponnusamy, D. Haridas, M. Jain, A. K. Ganti, and S. K. Batra.** 2012. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **16**:15-31.
 138. **Seth, D., K. Shaw, J. Jazayeri, and P. J. Leedman.** 1999. Complex post-transcriptional regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF-alpha in human prostate cancer cells. *Br J Cancer* **80**:657-69.

139. **Shepherd, F. A., J. Rodrigues Pereira, T. Ciuleanu, E. H. Tan, V. Hirsh, S. Thongprasert, D. Campos, S. Maoleekoonpiroj, M. Smylie, R. Martins, M. van Kooten, M. Dediu, B. Findlay, D. Tu, D. Johnston, A. Bezjak, G. Clark, P. Santabarbara, and L. Seymour.** 2005. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **353**:123-32.
140. **Shi, C., S. M. Hong, P. Lim, H. Kamiyama, M. Khan, R. A. Anders, M. Goggins, R. H. Hruban, and J. R. Eshleman.** 2009. KRAS2 mutations in human pancreatic acinar-ductal metaplastic lesions are limited to those with PanIN: implications for the human pancreatic cancer cell of origin. *Mol Cancer Res* **7**:230-6.
141. **Shibata, H., K. Toyama, H. Shioya, M. Ito, M. Hirota, S. Hasegawa, H. Matsumoto, H. Takano, T. Akiyama, K. Toyoshima, R. Kanamaru, Y. Kanegae, I. Saito, Y. Nakamura, K. Shiba, and T. Noda.** 1997. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* **278**:120-3.
142. **Shigematsu, H., L. Lin, T. Takahashi, M. Nomura, M. Suzuki, Wistuba, II, K. M. Fong, H. Lee, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, Z. Feng, J. A. Roth, J. Herz, J. D. Minna, and A. F. Gazdar.** 2005. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* **97**:339-46.
143. **Shtiegman, K., and Y. Yarden.** 2003. The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. *Semin Cancer Biol* **13**:29-40.
144. **Slaaby, R., T. Jensen, H. S. Hansen, M. A. Frohman, and K. Seedorf.** 1998. PLD2 complexes with the EGF receptor and undergoes tyrosine phosphorylation at a single site upon agonist stimulation. *J Biol Chem* **273**:33722-7.
145. **Slichenmyer, W. J., and D. W. Fry.** 2001. Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Semin Oncol* **28**:67-79.
146. **Smith, W. L., E. A. Meade, and D. L. DeWitt.** 1994. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. *Ann N Y Acad Sci* **714**:136-42.
147. **Sordella, R., D. W. Bell, D. A. Haber, and J. Settleman.** 2004. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **305**:1163-7.

148. **Stanger, B. Z., B. Stiles, G. Y. Lauwers, N. Bardeesy, M. Mendoza, Y. Wang, A. Greenwood, K. H. Cheng, M. McLaughlin, D. Brown, R. A. Depinho, H. Wu, D. A. Melton, and Y. Dor.** 2005. Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell* **8**:185-95.
149. **Taipale, J., and P. A. Beachy.** 2001. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* **411**:349-54.
150. **Thayer, S. P., M. P. di Magliano, P. W. Heiser, C. M. Nielsen, D. J. Roberts, G. Y. Lauwers, Y. P. Qi, S. Gysin, C. Fernandez-del Castillo, V. Yajnik, B. Antoniu, M. McMahon, A. L. Warshaw, and M. Hebrok.** 2003. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* **425**:851-6.
151. **Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J. C. Fiddes, and J. A. Abraham.** 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* **266**:11947-54.
152. **Tobita, K., H. Kijima, S. Dowaki, H. Kashiwagi, Y. Ohtani, Y. Oida, H. Yamazaki, M. Nakamura, Y. Ueyama, M. Tanaka, S. Inokuchi, and H. Makuuchi.** 2003. Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *Int J Mol Med* **11**:305-9.
153. **Ueda, S., S. Ogata, H. Tsuda, N. Kawarabayashi, M. Kimura, Y. Sugiura, S. Tamai, O. Matsubara, K. Hatsuse, and H. Mochizuki.** 2004. The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* **29**:e1-8.
154. **Vakkila, J., and M. T. Lotze.** 2004. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* **4**:641-8.
155. **van Heek, N. T., A. K. Meeker, S. E. Kern, C. J. Yeo, K. D. Lillemoe, J. L. Cameron, G. J. Offerhaus, J. L. Hicks, R. E. Wilentz, M. G. Goggins, A. M. De Marzo, R. H. Hruban, and A. Maitra.** 2002. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* **161**:1541-7.

156. **van Krieken, J. H., A. Jung, T. Kirchner, F. Carneiro, R. Seruca, F. T. Bosman, P. Quirke, J. F. Flejou, T. Plato Hansen, G. de Hertogh, P. Jares, C. Langner, G. Hoefler, M. Ligtenberg, D. Tiniakos, S. Tejpar, G. Bevilacqua, and A. Ensari.** 2008. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* **453**:417-31.
157. **Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban, and M. Goggins.** 2011. Pancreatic cancer. *Lancet* **378**:607-20.
158. **Von Hoff, D. D., R. K. Ramanathan, M. J. Borad, D. A. Laheru, L. S. Smith, T. E. Wood, R. L. Korn, N. Desai, V. Trieu, J. L. Iglesias, H. Zhang, P. Soon-Shiong, T. Shi, N. V. Rajeshkumar, A. Maitra, and M. Hidalgo.** 2011. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J Clin Oncol* **29**:4548-54.
159. **Wahl, M. I., S. Nishibe, J. W. Kim, H. Kim, S. G. Rhee, and G. Carpenter.** 1990. Identification of two epidermal growth factor-sensitive tyrosine phosphorylation sites of phospholipase C-gamma in intact HSC-1 cells. *J Biol Chem* **265**:3944-8.
160. **Watkins, D. N., D. M. Berman, and S. B. Baylin.** 2003. Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer. *Cell Cycle* **2**:196-8.
161. **Wells, A., J. B. Welsh, C. S. Lazar, H. S. Wiley, G. N. Gill, and M. G. Rosenfeld.** 1990. Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science* **247**:962-4.
162. **Witkowski, E. R., J. K. Smith, and J. F. Tseng.** 2013. Outcomes following resection of pancreatic cancer. *J Surg Oncol* **107**:97-103.
163. **Wong, A. J., S. H. Bigner, D. D. Bigner, K. W. Kinzler, S. R. Hamilton, and B. Vogelstein.** 1987. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:6899-903.

164. **Worthylake, R., L. K. Opresko, and H. S. Wiley.** 1999. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* **274**:8865-74.
165. **Wu, J., Y. Jiao, M. Dal Molin, A. Maitra, R. F. de Wilde, L. D. Wood, J. R. Eshleman, M. G. Goggins, C. L. Wolfgang, M. I. Canto, R. D. Schulick, B. H. Edil, M. A. Choti, V. Adsay, D. S. Klimstra, G. J. Offerhaus, A. P. Klein, L. Kopelovich, H. Carter, R. Karchin, P. J. Allen, C. M. Schmidt, Y. Naito, L. A. Diaz, Jr., K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, R. H. Hruban, and B. Vogelstein.** 2011. Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:21188-93.
166. **Wu, J., H. Matthaei, A. Maitra, M. Dal Molin, L. D. Wood, J. R. Eshleman, M. Goggins, M. I. Canto, R. D. Schulick, B. H. Edil, C. L. Wolfgang, A. P. Klein, L. A. Diaz, Jr., P. J. Allen, C. M. Schmidt, K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, R. H. Hruban, and B. Vogelstein.** 2011. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med* **3**:92ra66.
167. **Xin, W., K. J. Yun, F. Ricci, M. Zahurak, W. Qiu, G. H. Su, C. J. Yeo, R. H. Hruban, S. E. Kern, and C. A. Iacobuzio-Donahue.** 2004. MAP2K4/MKK4 expression in pancreatic cancer: genetic validation of immunohistochemistry and relationship to disease course. *Clin Cancer Res* **10**:8516-20.
168. **Yarden, Y.** 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**:S3-8.
169. **Yarden, Y., and M. X. Sliwkowski.** 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:127-37.
170. **Ying, H., K. G. Elpek, A. Vinjamoori, S. M. Zimmerman, G. C. Chu, H. Yan, E. Fletcher-Sananikone, H. Zhang, Y. Liu, W. Wang, X. Ren, H. Zheng, A. C. Kimmelman, J. H. Paik, C. Lim, S. R. Perry, S. Jiang, B. Malinn, A. Protopopov, S. Colla, Y. Xiao, A. F. Hezel, N. Bardeesy, S. J. Turley, Y. A. Wang, L. Chin, S. P. Thayer, and R. A. DePinho.** 2011. PTEN is a major tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates an NF-kappaB-cytokine network. *Cancer Discov* **1**:158-69.

171. **Zandi, R., A. B. Larsen, P. Andersen, M. T. Stockhausen, and H. S. Poulsen.** 2007. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* **19**:2013-23.
172. **Zavoral, M., P. Minarikova, F. Zavada, C. Salek, and M. Minarik.** 2011. Molecular biology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* **17**:2897-908.
173. **Zhang, Y., L. Chen, J. Yang, J. B. Fleming, P. J. Chiao, C. D. Logsdon, and M. Li.** 2013. Study human pancreatic cancer in mice: how close are they? *Biochim Biophys Acta* **1835**:110-8.
174. **Zhao, S., Y. Wang, L. Cao, M. M. Ouellette, and J. W. Freeman.** 2010. Expression of oncogenic K-ras and loss of Smad4 cooperate to induce the expression of EGFR and to promote invasion of immortalized human pancreas ductal cells. *Int J Cancer* **127**:2076-87.

Anexos

CURRICULUM VITAE

NAME: Carolina Navas Cuerva

DATE OF BIRTH: 27 October 1982

PLACE OF BIRTH: Madrid, Spain

COUNTRY OF CITIZENSHIP: Spain

e-mail: carolinanavascuerva@hotmail.com; cnavas@cniio.es

EDUCATION:

2000-2006 Veterinary Science in Universidad Complutense, Madrid.

2006-2007 Teaching Certificate in Universidad Complutense, Madrid

2007-2008 Diploma of Advanced Studies in Biochemistry, molecular biology and biomedicine by Universidad Autonoma, Madrid.

2008-2013 PhD student in Experimental Oncology lab in CNIO, Madrid.

ORAL PRESENTATIONS:

1st University Congress of Veterinary Science and Biomedicine: “Involución del timo en ovejas de raza rubia del Molar” (Thymus involucion in rubia del Molar sheep), supervised by Professor Cristina Novoa Martínez and Professor Ximena Pickering Thompson. April 2002.

2nd University Congress of Veterinary Science and Biomedicine: “Premedicación y Anestesia Inhalatoria en équidos” (Inhalatory Anesthesia and premedication in horses), supervised by Professor Manuel San Andrés Larrea. April 2003.

3rd University Congress of Veterinary Science and Biomedicine: “Torsión Pulmonar espontánea en un cachorro” (Spontaneous lung torsion in a dog pup), supervised by Professor Cristina Novoa Martínez and Professor Ximena Pickering Thompson. April 2004

Mundial Congress of Comparative Patology in Portugal: “Torsión Pulmonar espontánea en un cachorro” (Spontaneous lung torsion in a dog pup). (2004)

CNIO Progress Report: Interaction between CARD domains. June 2008.

CNIO Progress Report: Role of inflammation in pancreatic tumor development. July 2010.

CNIO Progress Report: Role of EGFR in pancreatic tumor development. June 2012.

The 2nd JSGE International Topic Conference during the 99th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology: “The role of EGFR in pancreatic tumor development” March 2013.

POSTER PRESENTATIONS:

Cell Symposia, Hallmarks of Cancer: “EGF Receptor Signaling Is Essential for K-Ras Oncogene-Driven Pancreatic Ductal Adenocarcinoma”. **Navas C**, Hernández-Porras I, Schuhmacher A, Sibilia M, Guerra C, Barbacid M. October 2012.

11th Transgenic Technology (TT) Meeting: “Tetracycline-dependent-FlpO-mediated recombination in mice”. Muñoz J, Vargiu P, **Navas C**, Martín J, Gómez C, Prieto P, Riffo M, Guerra C, Barbacid M and Ortega S. February 2013.

AWARDS:

Prize at the best scientific communications in 3rd University Congress of Veterinary Science and Biomedicine.

TECHNICAL SKILLS DEVELOPED DURING PhD:

Western Blot, Immunoprecipitation, Subcellular fractioning, Southern Blot, LCM (Laser Capture Microdissection), PCR and real-time PCR, mutagenesis assays, immunohistochemistry, immunofluorescence, optical and confocal microscope analysis, X-Gal and senescence assays, shRNA sequences design, cloning

strategies, cell proliferation assays, cell culture in collagen plates, transdiferentation of acinar culture.

Experimental animals manipulations, drugs administration in experimental animals, surgery techniques in mice.

SCIENTIFIC TEACHING AND SUPERVISION:

2010: Supervision of a two high school students (6 months).

2011: Supervision of an undergraduate student (3 months).

PUBLICATIONS:

Rivera J, Megías D, **Navas C**, Bravo J (2009). Identification of essential sequences for cellular localization in BRMS1 metastasis suppressor. PLoS ONE 30, 1-10

Guerra C, Collado M, **Navas C**, Schuhmacher A, Hernández-Porras I, Cañamero M, Rodriguez Justo M, Serrano M and Barbacid M (2011). Pancreatitis–induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting Oncogene- Induced Senescence. Cancer Cell 14, 728-39.

Navas C, Hernández-Porras I, Schuhmacher A, Sibilia M, Guerra C, Barbacid M (2012). EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell 11, 318-30.

Angela Monasor; Matilde Murga; Andres Joaquin Lopez-Contreras; **Carolina Navas**; Gonzalo Gomez; David Gonzalez Pisano; Oscar Fernandez-Capetillo. (2013). INK4a/ARF limits the expansion of cells suffering from replication stress. Cell Cycle 12.

Pancreatitis-Induced Inflammation Contributes to Pancreatic Cancer by Inhibiting Oncogene-Induced Senescence

Carmen Guerra,^{1,*} Manuel Collado,² Carolina Navas,¹ Alberto J. Schuhmacher,^{1,5} Isabel Hernández-Porras,¹ Marta Cañamero,³ Manuel Rodríguez-Justo,⁴ Manuel Serrano,² and Mariano Barbacid^{1,*}

¹Experimental Oncology

²Tumour Suppressor Groups, Molecular Oncology Programme

³Comparative Pathology Unit, Biotechnology Programme

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), E-28029 Madrid, Spain

⁴Department of Pathology, University College London NHS Trust, University Street, WC1E 6JJ London, UK

⁵Present address: Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021, USA

*Correspondence: mcguerra@cnio.es (C.G.), mbarbacid@cnio.es (M.B.)

DOI 10.1016/j.ccr.2011.05.011

SUMMARY

Pancreatic acinar cells of adult mice (\geq P60) are resistant to transformation by some of the most robust oncogenic insults including expression of *K-Ras* oncogenes and loss of *p16Ink4a/p19Arf* or *Trp53* tumor suppressors. Yet, these acinar cells yield pancreatic intraepithelial neoplasias (mPanIN) and ductal adenocarcinomas (mPDAC) if exposed to limited bouts of non-acute pancreatitis, providing they harbor *K-Ras* oncogenes. Pancreatitis contributes to tumor progression by abrogating the senescence barrier characteristic of low-grade mPanINs. Attenuation of pancreatitis-induced inflammation also accelerates tissue repair and thwarts mPanIN expansion. Patients with chronic pancreatitis display senescent PanINs, providing they have received antiinflammatory drugs. These results support the concept that antiinflammatory treatment of people diagnosed with pancreatitis may reduce their risk of developing PDAC.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the tumors with worst prognosis, with <5% of patients surviving 5 years after diagnosis. During the last few years there have been important advances in our understanding of the molecular events responsible for the development of PDAC (Jones et al., 2008; Hruban and Adsay, 2009). Yet, progress in prevention, early diagnosis and therapeutic treatment of PDAC has not experienced major advances (Hidalgo, 2010).

The development of genetically modified mouse tumor models of PDAC offers the possibility to replicate in experimental systems the multiple events that lead to this complex disease (Hingorani et al., 2003; Guerra et al., 2007). In these models, inducible expression of a resident *K-Ras* oncogene during embry-

onic development triggers preneoplastic pancreatic intraepithelial lesions (mPanINs), which can progress into invasive mPDAC. Addition of other mutations observed in human PDAC, including inactivation of the *P16INK4A/P19ARF*, *TRP53*, or *SMAD4* tumor suppressors as well as activation of the HEDGEHOG signaling pathway, significantly accelerate tumor development leading to acquisition of a metastatic phenotype (Aguirre et al., 2003; Hingorani et al., 2005; Bardeesy et al., 2006; Ijichi et al., 2006; Pasca di Magliano et al., 2006).

Human PDAC is likely to originate from somatic mutations in *K-RAS* during adulthood rather than during embryonic development. We have previously shown that activation of a resident *K-Ras* oncogene in adult mice does not induce mPanINs and mPDAC (Guerra et al., 2007). Recently, it has been shown that rat adult acinar cells are also refractory to

Significance

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the tumor types with worst prognosis. Efforts to understand its etiology and early development may help to save lives. Here we report that brief bouts of asymptomatic pancreatitis in adult mice lead to mPDAC as long as the acinar cells express *K-Ras* oncogenes. *K-Ras* mutations occurring after pancreatitis also induce mPDAC providing that the inflammatory response has not subsided. Inflammation contributes to mPDAC by eliminating the senescence program characteristic of benign lesions. Samples obtained from pancreatitis patients also display senescence markers but only if they have received antiinflammatory therapy. Thus, antiinflammatory treatment of patients diagnosed with even mild bouts of pancreatitis may prevent, or at least reduce the risk of developing PDAC.

transformation by Ras oncogenes (Tanaka et al., 2010). The resistance of adult acinar cells to K-Ras oncogenes may stem from the exhaustion of permissive acinar progenitors or from intrinsic changes in the biology of acinar cells during adulthood.

In this study, we have examined whether the resistance of adult acinar cells to malignant transformation by K-Ras oncogenes may result from the existence of a proliferative and/or senescence barrier mediated by p16Ink4a, a gene frequently inactivated in human PDAC, or by other tumor suppressors also implicated in PDAC development such as Trp53 (Collado et al., 2005). In addition, we have examined whether limited episodes of pancreatitis may cooperate with K-Ras oncogenes to induce mPDAC and have unveiled some of the mechanisms by which pancreatitis contributes to mPanIN development. Finally, we have extended these observations to human biopsies obtained from pancreatitis and PDAC patients.

RESULTS

Adult Acinar Cells Are Resistant to Multiple Oncogenic Insults

Expression of an endogenous K-Ras oncogene in acinar cells of K-Ras^{+/LSL;G12V^{geo}} mice (designated from now on as K-Ras^{G12V}) during late embryonic development (E16.5) leads to the generation of acinar-to-ductal metaplasias followed by the appearance of low and high-grade mPanINs that occasionally progress to mPDAC (Guerra et al., 2007). The neoplastic nature of these lesions has been validated by other investigators (Hruban et al., 2006). The percentage of K-Ras^{G12V}-expressing acinar cells susceptible of inducing mPanIN lesions become significantly reduced during early postnatal development (see Figure S1A available online). In agreement with other laboratories (Gidekel Friedlander et al., 2009; Morris et al., 2010), induction of K-Ras^{G12V} expression at 3 (P21) and 6 (P42) weeks of age resulted in progressive reduction in the number of mice that developed mPanINs and to a significant delay in the onset of mPDAC. Acinar cells become resistant to mPanIN development when mice become 2 months old (P60) (Figure S1). Other groups have described frequent mPanIN induction on expression of K-Ras oncogenes in acinar cells of 6-week-old mice (De La O et al., 2008; Habbe et al., 2008). Although the bases for these variations are unknown, it is possible that genetic background may determine the precise timing at which postnatal acinar cells become resistant to transformation by K-Ras oncogenes.

Next, we examined whether this resistance could be overcome by inactivation of the oncogene-induced senescence (OIS) barrier likely to be mediated by tumor suppressors such as p16Ink4a/p19Arf or Trp53 (Collado and Serrano, 2010). Compound K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre;p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox} (n = 13) and K-Ras^{+/G12V};Trp53^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre (n = 7) mice were exposed to doxycycline from conception until P60 to prevent expression of the Elastase-driven Cre recombinase. Removal of doxycycline from the drinking water allowed K-Ras^{G12V} expression in adult acinar cells along with concomitant ablation of the p16Ink4a/p19Arf^{lox} and Trp53^{lox} conditional alleles, respectively (Figures 1A and 1B). Mice were examined for the presence of pancreatic lesions 6 and 12 months after removal of doxycycline. Surprisingly, none of the pancreata presented detectable lesions including meta-

plasias or low-grade mPanINs in spite of serial analysis of the entire organ (Figures 1A and 1B). Excision of the conditional p16Ink4a/p19Arf^{lox} and Trp53^{lox} alleles in K-Ras^{G12V}-expressing acinar cells was confirmed by PCR analysis of DNA extracted from β -galactosidase expressing cells, the surrogate marker for K-Ras^{G12V} expression (Guerra et al., 2007), with the help of a laser-capture microscope (Figures S1B and S1C). These observations indicate that adult acinar cells are extremely resistant to malignant transformation and can tolerate some of the most robust genetic insults responsible for neoplastic development.

Loss of p16Ink4a/p19Arf and Trp53 in Adult Acinar Cells Only Contribute to mPanIN and mPDAC Development in the Presence of K-Ras Oncogenes

In addition to K-RAS mutations, most human PanINs display inactivation of the P16INK4a/P14ARF locus. Thus, we examined whether pancreatitis may also cooperate with loss of these tumor suppressors to initiate mPanIN formation in the absence of K-Ras mutations. We induced pancreatitis by treating mice with daily doses of caerulein, a decapeptide analog of the pancreatic secretagogue cholecystokinin, as previously described (Guerra et al., 2007). K-Ras^{+/+};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre mice exposed to doxycycline until P60 were treated with caerulein and examined at 14 months of age. Systematic analysis of their pancreata (n = 8) by serial sectioning failed to reveal any mPanINs (Figures 1C and 1D). Because TRP53 is also lost in many human PDACs, we examined whether pancreatitis cooperated with loss of this tumor suppressor to induce mPanIN formation in adult mice. K-Ras^{+/+};Trp53^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre mice (n = 4) exposed to doxycycline until P60 and treated with caerulein also failed to display mPanINs in spite of serially sectioning of all pancreata (Figures 1C and 1D). As expected, control K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre mice (8/8) submitted to the same treatments developed abundant low and high-grade mPanINs (data not shown). These observations indicate that activation of K-Ras oncogenes is an essential event to initiate mPanIN formation that cannot be replaced by loss of either p16Ink4a/p19Arf or Trp53 tumor suppressors.

Loss of the p16Ink4a/p19Arf tumor suppressors in early pancreatic precursors during embryonic development efficiently cooperated with K-Ras oncogenes to induce invasive and metastatic mPDAC (Aguirre et al., 2003). Activation of K-Ras oncogenes along with concomitant loss of p16Ink4a/p19Arf in embryonic acinar cells also resulted in anaplastic carcinomas that metastasized to liver, stomach, diaphragm, lung, lymph nodes and spleen (Figures 2D and 2E). Thus, we examined whether loss of p16Ink4a/p19Arf could cooperate with K-Ras^{G12V} in adult mice. P90 K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre mice exposed to doxycycline until P60 were treated with caerulein to induce pancreatitis. As illustrated in Figure 2A, the lifespan of these mice was considerably shortened compared to mice that retained the p16Ink4a/p19Arf locus. Survival of heterozygous p16Ink4a/p19Arf^{+/lox} mice was similar to that of wild-type controls (data not shown). After 3 months of caerulein treatment, the number of low-grade mPanINs did not differ significantly between p16Ink4a/p19Arf wild-type, heterozygous, or null mice (Figures 2B and 2C). However, the latter contained more high-grade lesions and developed mPDAC (Figures 2B and 2C;

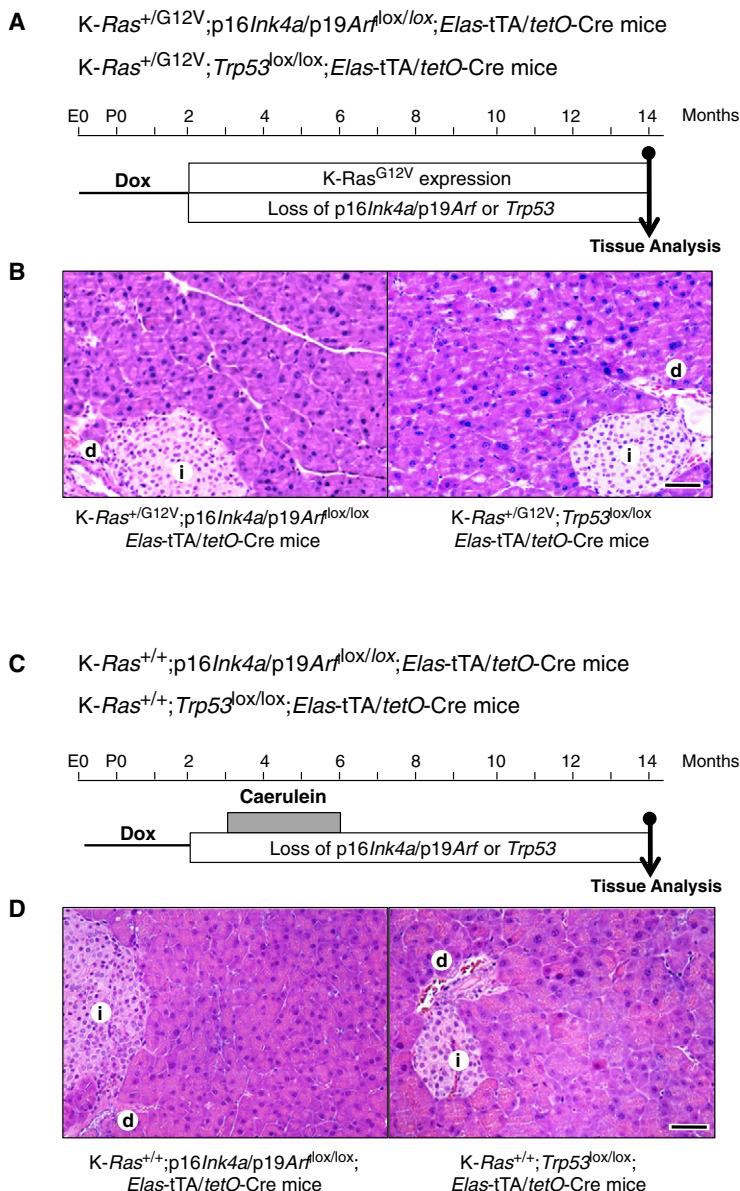


Figure 1. Loss of *p16Ink4a/p19Arf* or *Trp53* Tumor Suppressors Only Contribute to mPanIN and mPDAC Development in the Presence of *K-Ras* Oncogenes and Pancreatitis

(A) $K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre$ and $K-Ras^{+/G12V};Trp53^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre$ mice were exposed to doxycycline (Dox, thin line) until P60. At this time, doxycycline was removed from the drinking water to allow expression of the $K-Ras^{G12V}$ oncogene and to ablate the *p16Ink4a/p19Arf* and the *Trp53* tumor suppressors in adult acinar cells.

(B) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of paraffin sections obtained from 14-month-old (left) $K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre$ mice and (right) $K-Ras^{+/G12V};Trp53^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre$ mice shows normal parenchyma with no mPanIN lesions 1 year after turning on $K-Ras^{G12V}$ expression and ablating the *p16Ink4a/p19Arf* and the *Trp53* tumor suppressors. i, islets; d, normal ducts. Scale bar represents 50 μm .

(C) $K-Ras^{+/+};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre$ and $K-Ras^{+/+};Trp53^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre$ mice were exposed to doxycycline (Dox, thin line) until P60. At this time, doxycycline was removed from the drinking water to allow ablation of the *p16Ink4a/p19Arf* and the *Trp53* tumor suppressors in adult acinar cells. Mice were subsequently treated with caerulein for three months (P90–P180) (gray box).

(D) H&E staining of paraffin sections obtained from 14-month-old (left) $K-Ras^{+/+};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre$ mice and (right) $K-Ras^{+/+};Trp53^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre$ mice shows normal parenchyma with no mPanIN lesions 8 months after finishing caerulein treatment. i, islets; d, normal duct. Scale bar represents 50 μm .

See also Figure S1.

Figures S2A–S2H). Analysis of these tumors at humane end point revealed that many of these mPDAC (Figures S2I–S2L) had also metastasized to liver and diaphragm (Figures S2M–S2P). Moreover, we also observed an occasional sarcomatoid tumor when mice were sacrificed at humane end point (data not shown). These observations indicate that loss of *p16Ink4a/p19Arf* contributes to pancreatic cancer in adult mice, providing that the mice express *K-Ras* oncogenes and have suffered from pancreatitis.

Episodic Pancreatitis Is Sufficient to Induce mPanINs and mPDAC in $K-Ras^{G12V}$ Expressing Adult Acinar Cells

Chronic pancreatitis is one of the highest risk factors for the development of PDAC in humans (Lowenfels et al., 1993; Malka et al., 2002). In adult mice ($p \geq 60$), chronic pancreatitis is essen-

tial to induce mPanIN lesions and mPDAC in acinar cells expressing a resident $K-Ras^{G12V}$ oncogene (Guerra et al., 2007). Yet, it is not known whether short episodes of pancreatitis may also represent a risk for PDAC development. To explore this possibility, we exposed adult (P90) $K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre$ mice to caerulein for 3 months, 30 days after turning on $K-Ras^{G12V}$ expression. This treatment had no detectable consequences on the overall health of the animals. In spite of its asymptomatic nature, this treatment led to significant atrophy in the parenchyma including mucinous metaplasia, edema and fibrosis regardless of whether the mice expressed a *K-Ras* oncogene (Figure S3A). In addition, all animals exhibited an inflammatory response throughout the entire parenchyma, primarily made up of macrophages and T lymphocytes (data not shown). At 8 months of age, 2 months after cessation of the caerulein treatment, all $K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre$ mice ($n = 15$), but not control $K-Ras^{+/+};Elas-tTA/tetO-Cre$ animals ($n = 7$), displayed low and high-grade mPanIN lesions (Figure 3A). At this time, the pancreata of control mice showed limited improvement of atrophic areas and decreased numbers of inflammatory cells. Mutant mice, however, displayed increased atrophy and fibrosis, whose levels were directly related to the number and extent of the mPanIN lesions (data not shown). In these mutant mice, the inflammatory cells, mainly macrophages and T lymphocytes, were abundant and closely associated with mPanIN lesions (Figure 4B).

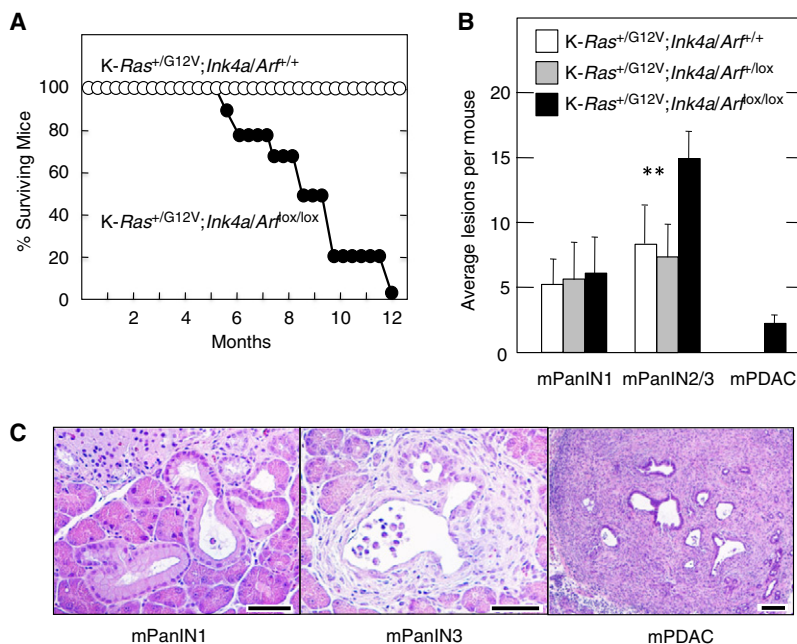


Figure 2. Loss of p16Ink4a/p19Arf Tumor Suppressors Accelerates mPanIN and mPDAC Development and Induces Anaplastic Sarcomatoid Tumors

(A) Survival of (solid circles) *K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre* and (open circles) *K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{+/+};Elas-tTA/tetO-Cre* mice exposed to doxycycline until P60. At this time, doxycycline was removed from the drinking water to activate *K-Ras^{G12V}* expression and to ablate the p16Ink4a/p13Arf tumor suppressors. Caerulein treatment started at P90.

(B) Average number of mPanIN1, mPanIN2/3 and mPDAC lesions displayed at 6 months of age by (solid bars) *K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre* (n = 5), (gray bars) *K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{+/+};Elas-tTA/tetO-Cre* (n = 4) and (open bars) *K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{+/+};Elas-tTA/tetO-Cre* (n = 5) mice treated as described in (A). Data shown represent mean \pm SD. **p < 0.01.

(C) H&E stained paraffin sections depicting representative (left) low-grade mPanIN1, (middle) high-grade mPanIN3, and (right) mPDAC lesions observed in the *K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre* mice described in (B). The scale bars represent (left and center) 20 μ m and (right) 50 μ m.

See also Figure S2.

When control *K-Ras^{+/+};Elas-tTA/tetO-Cre* mice (n = 15) were examined 6 months later, their pancreata had recovered almost completely and we only observed few areas of inflammatory cells. *K-Ras^{G12V}*-expressing pancreata had also recovered except for areas of atrophy intimately associated with the mPanIN lesions. The levels of inflammatory cells had also subsided except for those closely associated with the mPanIN lesions (data not shown). At this time, all mice displayed low and high-grade mPanIN lesions (Figure 3A; Figure S3B). Moreover, 3 of the 15 *K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre* animals had developed mPDAC,

of which two showed invasion of the proximal parenchyma and one displayed metastasis in liver and lung (Figure 3A; Figures S3C–S3I). These mPDACs displayed high levels of stroma similar to those observed in human patients (Figures S3C and S3D). In these lesions, inflammatory cells persisted but were located in the periphery of the stroma that surrounded the glandular structures of the tumor (Figure 4C; Figure S3F).

Next, we reduced the time of caerulein exposure to 1 month (Figure 3B). This shorter treatment also induced parenchyma atrophy and recruitment of inflammatory cells, although the

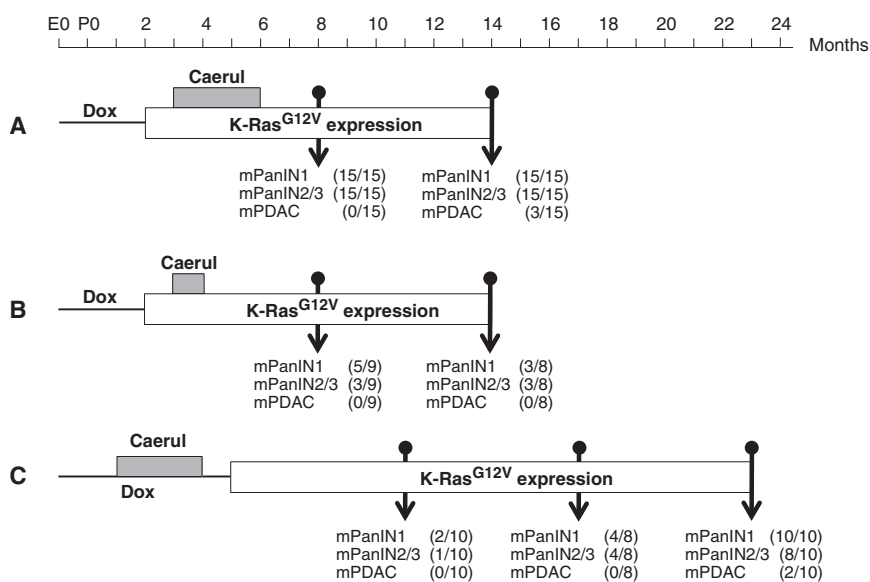


Figure 3. Episodic Pancreatitis Induces mPanINs and mPDAC in *K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre* Mice

K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre mice were exposed to doxycycline (thin line) and caerulein (gray box) for the indicated periods of time. The open box indicates the time of *K-Ras^{G12V}* expression. The number of animals positive for low-grade mPanIN1, high-grade mPanIN2/3, and mPDAC is indicated for each protocol and time point.

(A) Mice exposed to doxycycline (Dox) from conception (E0) to P60 were treated with caerulein (Caerul) for 3 months, from P90 to P180. Mice were sacrificed at 8 and 14 months of age, that is 6 and 12 months after turning on *K-Ras^{G12V}* expression.

(B) Mice exposed to doxycycline from conception (E0) to P60 were treated with caerulein for 1 month, from P90 to P120. Mice were sacrificed at 8 and 14 months of age, that is 6 and 12 months after turning on *K-Ras^{G12V}* expression.

(C) Mice exposed to doxycycline from conception (E0) to P150 were treated with caerulein for 3 months, from P30 to P120. Mice were sacrificed at 11, 17, and 23 months of age, that is, 6, 12, and 18 months after turning on *K-Ras^{G12V}* expression.

See also Figure S3.

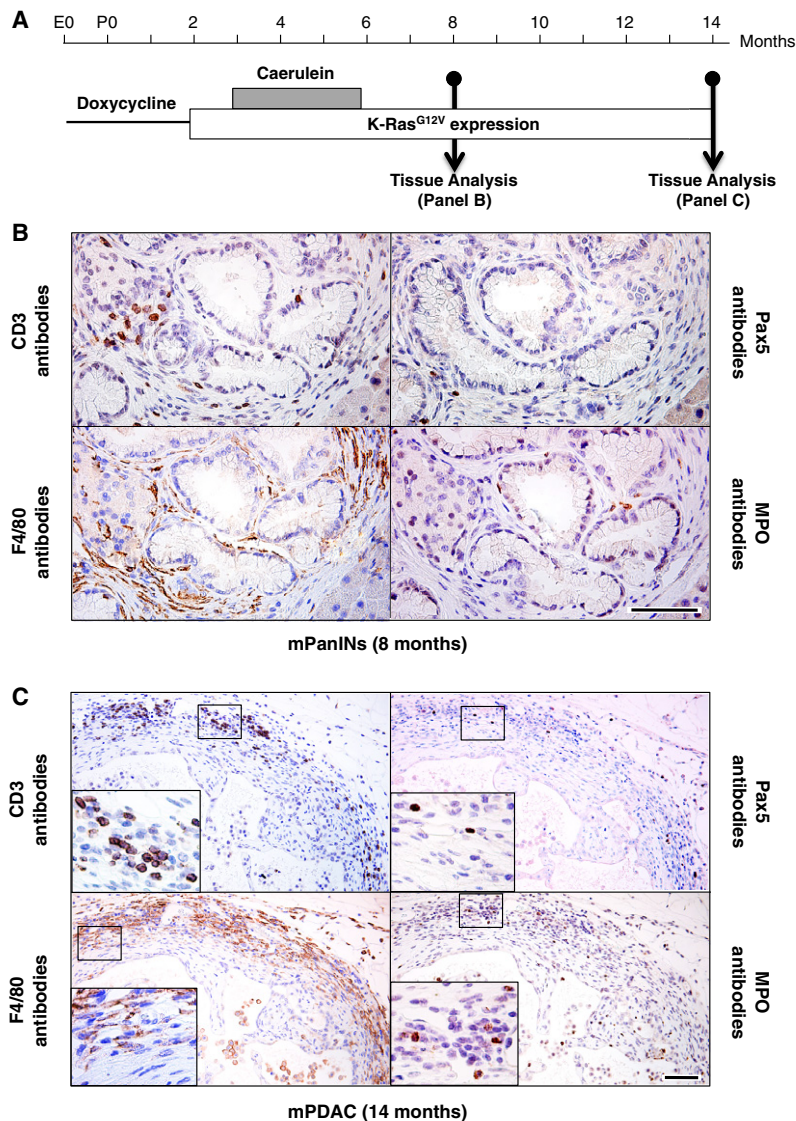


Figure 4. Inflammatory Infiltrates in mPanIN Lesions and mPDAC in K-Ras^{G12V} Expressing Adult Mice Treated with Caerulein for Three Months

(A) K-Ras^{+G12V};Elas-tTA/tetO-Cre mice were exposed to doxycycline (thin line) and caerulein (gray box) for the indicated periods of time. Expression of the K-Ras^{G12V} oncogene (open box) is indicated. Mice were sacrificed at 8 and 14 month of age.

(B and C) Immunostaining of inflammatory cells surrounding (B) mPanIN lesions in 8-month-old mice (2 months after cessation of caerulein) and (C) mPDAC in 14-month-old mice (8 months after cessation of caerulein treatment) using antibodies against T lymphocytes (CD3 antibodies), B lymphocytes (Pax5 antibodies), macrophages (F4/80 antibodies), and neutrophils (MPO antibodies). Insets show detailed areas containing the corresponding immune cells. Scale bars represent 50 μm.

mPanIN and mPDAC in adult mice depends on the extent of tissue damage and the inflammatory response.

We also interrogated whether PDAC development required the presence of K-Ras oncogenes at the time of pancreatic damage. To this end, K-Ras^{+G12V};Elas-tTA/tetO-Cre mice were maintained in doxycycline until P150 while they were treated with caerulein from P30 to P120. Thus, mice had 1 month to recover from caerulein treatment before expressing their resident K-Ras^{G12V} oncogene (Figure 3C). Analysis of 10 pancreata at 6 months after turning on K-Ras^{G12V} expression (11 months of age) revealed the presence of mPanINs in few mice (Figure 3C). Six months later (17 months of age), the percentage of mice depicting mPanINs had increased to 50% (4/8) (Figure 3C). All animals (n = 10) displayed mPanINs on 18 months of continuous K-Ras^{G12V} expression (23 months of age) (Figure 3C; Figure S3O), and two of them had mPDACs that invaded the adjacent parenchyma (Figure 3C; Figure S3P). No lesions were observed when

extent of atrophic areas and inflammatory foci were significantly reduced (data not shown). When mice were analyzed at 8 months of age, 4 months after cessation of caerulein exposure, >50% of the mice (5/9) had developed low-grade mPanINs and three of them displayed high-grade lesions (Figure 3B; Figure S3J). At this time, the parenchyma was well preserved with few mucinous metaplasia and small focal areas of inflammatory cells, mostly associated with mPanIN lesions (data not shown). Analysis of K-Ras^{+G12V};Elas-tTA/tetO-Cre mice at 14 months of age revealed a similar percentage of animals with high-grade mPanINs (3/8) (Figure 3B; Figure S3J). However, none of them had developed mPDAC at this time. When we allowed these mice (n = 11) to age (1.5 and 3 years of age), we observed mPanIN lesions in most of them (10.2 ± 5.1 low-grade and 4.8 ± 2.6 high-grade mPanINs/mouse, respectively) with only one mouse failing to show any lesions. Yet, only two mice developed mPDAC (Figures S3K–S3N). These observations indicate that development of high-grade

K-Ras^{G12V} expression was activated at P150 in mice not exposed to caerulein (Figure S1A). These observations indicate that K-Ras oncogenes can initiate mPanIN and mPDAC development in adult mice providing that there is preexisting pancreatic damage and an inflammatory response.

Pancreatitis induces expression of genes characteristic of progenitor cells such as Pdx1 (Jensen et al., 2005; Fendrich et al., 2008) and Sox9 (Seymour et al., 2007; Yoshida et al., 2008), hence raising the possibility that the susceptibility to K-Ras oncogenic signaling might be due to the induction of a less mature differentiated state. As illustrated in Figure S3Q, caerulein treatment induces high levels of Pdx1 and Sox9 in acini as well as in metaplasias. However, Pdx1 expression faded away from the acinar cells within 30 days after caerulein withdrawal and was not expressed (except in very few cells) at the time (P150) when K-Ras^{G12V} expression was turned on (Figure S3Q). As previously reported, Pdx1 becomes reexpressed in low-grade mPanINs (Hingorani et al., 2003; Guerra et al., 2007; Morris et al.,

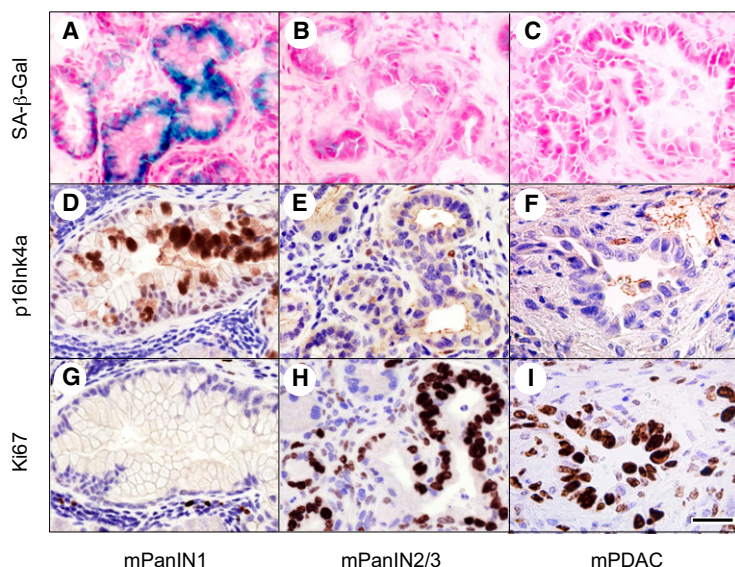


Figure 5. Senescence Markers Are a Feature of Low-Grade mPanINs, but Disappear in High-Grade mPanIN2/3 and mPDAC

(A–C) Senescence associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining (blue) in (A) low-grade mPanIN1 but not in (B) high-grade mPanIN2/3 or (C) mPDAC.

(D–F) p16Ink4a immunostaining (brown) in (D) low-grade mPanIN1 but not in (E) high-grade mPanIN2/3 or (F) mPDAC.

(G–I) Ki67 immunostaining (brown) inversely correlates with the expression of the above senescence markers. Ki67 is detected in a low percentage of cells of low-grade mPanIN1 (G) and in a high percentage of cells of high-grade mPanIN2/3 (H) and mPDAC (I). Note that (D–G), (E–H), and (F–I) correspond to serial sections. Scale bar represents 50 μ m.

See also Figure S4.

2010). Instead, Sox9 expression was maintained throughout the transformation process including metaplasias (Figure S3Q) and mPanINs (Morris et al., 2010). As expected, the expression pattern of acinar cell markers such as chymotrypsin and elastase was retained at the time of K-Ras^{G12V} expression as well as after a month of continuous oncogene expression (Figure S3Q).

The inflammatory response observed immediately after cessation of caerulein exposure (P120) (Figure S3R) significantly subsided 30 days later in both in wild-type and mutant mice (Figure S3S) at a time, P150, in which induction of K-Ras^{G12V} expression has not yet taken place (Figure 3C; Figure S3Q). At this time, we could only observe the presence of T lymphocytes (Figure S3S). Occasionally, isolated B lymphocytes, macrophages and neutrophils were also observed (Figure S3S). At P180, that is 30 days after turning on K-Ras^{G12V} expression, the inflammatory response remained at similar levels and no significant differences were observed between wild-type and mutant mice (Figure S3T). No mPanIN lesions were observed at either P150 or P180 (Figures S3S and S3T). Whether the presence of these inflammatory cells plays a key role in the subsequent development of mPanIN lesions remains to be determined.

The Senescence Program Present in Low-Grade mPanIN Is Abrogated during Progression to High-Grade mPanIN Lesions

Metaplasias and low-grade mPanINs observed in mice expressing K-Ras^{G12V} since embryonic development display senescence markers similar to those present in preneoplastic stages of other tumor types (Collado and Serrano, 2010). However, OIS is not an immediate consequence of K-Ras^{G12V} expression because morphologically normal acinar cells expressing this oncogene do not display senescence markers, regardless of whether K-Ras^{G12V} expression takes place in embryonic or adult acinar cells (Figure S4A; data not shown). Thus, induction of OIS must require additional changes likely to be involved in the acinar-ductal transdifferentiation process required to generate low-grade mPanIN lesions. Low-grade mPanINs developing in

K-Ras^{+/G12V};p16Ink4a/p19Arf^{lox/lox};Elas-tTA/tetO-Cre mice not exposed to doxycycline and hence lacking the p16Ink4a/p19Arf tumor suppressors since embryonic development did not display senescence markers (Figure S4B). Thus, indicating that these

tumor suppressors play a key role in the induction of senescence in low-grade mPanIN lesions.

The senescence phenotype of these low-grade mPanINs disappeared during tumor progression. As illustrated in Figure 5, high-grade mPanIN2/3 lesions as well as mPDAC were negative for senescence markers including endogenous senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) and expression of the p16Ink4a tumor suppressor. Expression of these senescence markers inversely correlated with the appearance of proliferative markers such as Ki67. Whereas Ki67 was expressed in <10% of the cells in SA- β -Gal positive mPanIN1 lesions, it was detected in >50% of the cells of high-grade mPanINs and mPDAC (Figure 5).

Pancreatitis-Induced Inflammation Contributes to mPanIN Development by Inhibiting OIS

Surprisingly, senescence markers were not present in low-grade mPanINs induced by K-Ras^{G12V} expression in adult mice, a process that requires exposure to caerulein. Thus, we decided to ascertain whether senescence was a property of lesions initiated in the embryonic pancreas or was inhibited by caerulein-induced pancreatitis. K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre mice expressing K-Ras^{G12V}, since late embryonic development were either allowed to develop mPanINs by themselves or were treated with caerulein for three months. Whereas the low-grade mPanINs present in control mice (not treated with caerulein) contained senescent cells (Figures 6A–6C), none of those mPanINs present in animals exposed to caerulein displayed senescence markers, including SA- β -Gal and p16Ink4a (Figures 6D–6F).

As described above, the pathological features characteristic of pancreatitis disappeared on withdrawal of caerulein. Thus, we examined whether progressive disappearance of the inflammatory response had any effect on senescence. Adult K-Ras^{+/G12V};Elas-tTA/tetO-Cre mice starting K-Ras^{G12V} expression at P60 were treated with caerulein for 3 months and either immediately sacrificed or allowed to recover for 3 additional months. Mice sacrificed at the end of the caerulein treatment

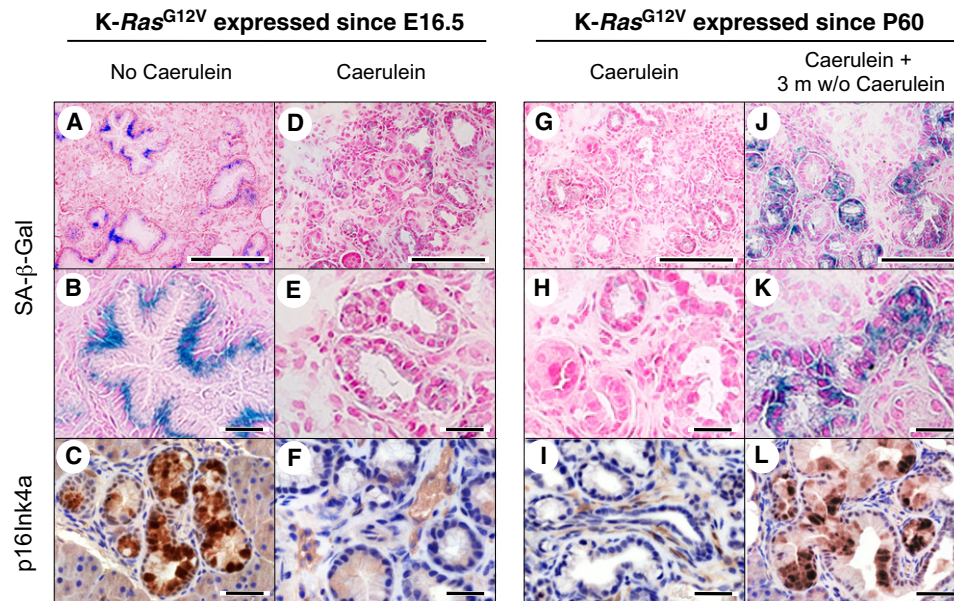


Figure 6. Senescent Low-Grade mPanINs Reappear on Partial Recovery from Pancreatitis Injury

(Left) *K-Ras^{G12V};Elas-tTA/tetO-Cre* mice not exposed to doxycycline, thus expressing the endogenous *K-Ras^{G12V}* oncogene since embryonic development (E16.5).

(A–C) Pancreatic sections showing low-grade mPanIN1 lesions. Sections were stained for (A and B) SA-β-Gal (blue), or (C) p16Ink4a (brown) expression. (B) Amplified version of (A) to better illustrate SA-β-Gal expression in mPanIN1 lesions.

(D–F) Pancreatic sections of mice treated with caerulein for 3 months (P60 to P150) depicting low-grade mPanIN1 lesions. Sections were stained for (D and E) SA-β-Gal (blue) or (F) p16Ink4a (brown) expression. (E) Amplified version of (D) to better illustrate the absence of SA-β-Gal expression in mPanIN1 lesions.

(Right) *K-Ras^{G12V};Elas-tTA/tetO-Cre* mice exposed to doxycycline from conception to P60, thus expressing the endogenous *K-Ras^{G12V}* oncogene since P60.

(G–I) Pancreatic sections of mice treated with caerulein for 3 months (P90–P180) showing low-grade mPanIN1 lesions. Sections were stained for (G and H) SA-β-Gal (blue) and (I) p16Ink4a (brown) expression. (H) is an amplified version of (G) to better illustrate the absence of SA-β-Gal expression in mPanIN1 lesions.

(J–L) Pancreatic sections of mice treated with caerulein for 3 months (P90–P180) and allowed to recover for 3 additional months showing low-grade mPanIN1 lesions. Sections were stained for (J and K) SA-β-Gal (blue) and (L) p16Ink4a (brown) expression. (K) Amplified version of (J) to better illustrate the reappearance of SA-β-Gal expression in mPanIN1 lesions. Scale bars represent 50 μm (A, D, G, and J) and 20 μm (B, C, E, F, H, I, K, and L).

See also Figure S5.

displayed low-grade mPanINs devoid of senescence markers (Figures 6G–6I). In contrast, those that were allowed to recover for 3 months had low-grade mPanINs positive for SA-β-Gal staining and p16Ink4a (Figures 6J–6L) as well as for PAI-1 and Sprouty-4 expression (Figure S5A). Indeed, senescence reappeared as shortly as 1 month after the cessation of caerulein exposure, a time when the inflammatory response had not completely subsided (Figure S5B). These observations indicate that OIS can be inhibited by limited episodes of pancreatitis but can reappear after the pancreatitis-induced damage has partially subsided.

Antiinflammatory Treatment Reverts Tissue Damage and Delays Progression of Pancreatitis-Induced mPanIN Lesions

To evaluate the overall contribution of inflammation to tumor progression, we studied the effect of Sulindac on mPanIN/mPDAC development. Sulindac is a nonsteroidal antiinflammatory drug thought to act on COX-1 and COX-2 enzymes (Smith et al., 1994). *K-Ras^{G12V};Elas-tTA/tetO-Cre* animals raised in the presence of doxycycline until P60 were treated with caerulein at P90 for 3 months. At the end of the treatment, mice were allowed to recover for 3 additional months either without further treatment or treated with Sulindac. Mice not exposed

to Sulindac displayed the typical lesions induced by pancreatitis such as parenchyma atrophy, edema and infiltration of inflammatory cells (Figure 7A; Figure S6A). Moreover, their pancreata exhibited multiple diffuse mPanIN lesions, ranging from low-grade mPanIN1A to invasive mPDAC, although most of them were high-grade mPanIN2/3 lesions (Figures 7A and 7B). In contrast, mice treated with Sulindac had well-preserved pancreata with few areas of parenchyma atrophy and limited infiltration of inflammatory cells (Figure 7A; Figure S6B). Moreover, we observed a dramatic reduction (75%) in the number of high-grade lesions (Figures 7A and 7B; Figure S6B). Perhaps more importantly, those lesions present in the Sulindac treated animals were considerably smaller (Figures 7A and 7C; Figure S6B). Whereas the average size of the high-grade mPanINs in control mice was 5.21 mm², those present in Sulindac-treated animals was only 0.14 mm², a dramatic 95% reduction (Figure 7C). These results strongly implicate inflammation as a key contributor to the effect of pancreatitis not only in promoting mPanIN formation, but also in inducing progression to mPDAC.

Pancreatitis-Induced Inflammation Blocks Senescence in Human PanINs

Finally, we examined whether some of these observations could be extended to human patients. To this end, we

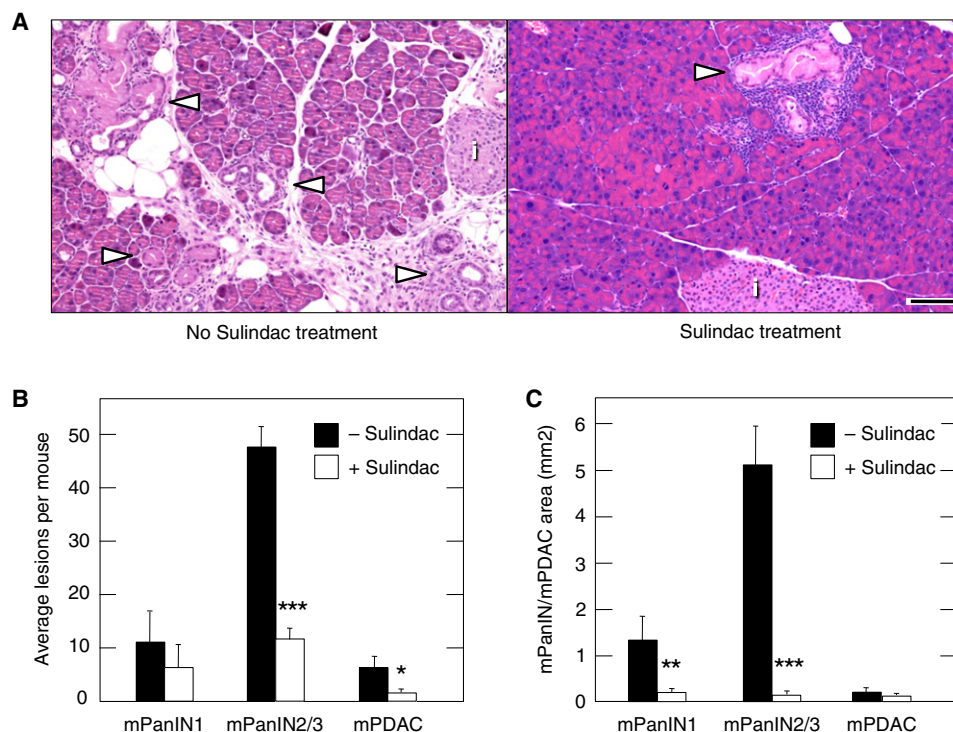


Figure 7. Inhibition of the Inflammatory Response by Sulindac Reverts Tissue Damage and Delays Progression of mPanIN Lesions

K-Ras^{G12V};Elas-tTA/tetO-Cre mice were exposed to doxycycline until P60. At this time, doxycycline was removed from the drinking water to achieve expression of *K-Ras^{G12V}*. Mice were subsequently treated with caerulein for 3 months (P90–P180). Half the mice were allowed to recover for 3 months without further treatment whereas the other half was treated with Sulindac.

(A) H&E-stained paraffin sections of representative pancreata of mice (left) not treated or (right) treated with Sulindac. Note that the pancreata of the untreated mice displayed high levels of edema, fibrosis, parenchyma atrophy, and abundant large mPanIN lesions. In contrast, mice that underwent Sulindac treatment showed a well-preserved parenchyma and contained few small mPanINs. Arrowheads point to mPanIN lesions, (i) indicates an islet. Scale bar represents 50 μ m.

(B) Average lesions per mouse. Solid bars indicate mice not treated with Sulindac ($n = 3$). Open bars correspond to mice treated with Sulindac ($n = 3$). Data shown represent mean \pm SD. *** $p < 0.00017$, * $p < 0.036$.

(C) Area of mPanIN1, mPanIN2/3 and mPDAC lesions observed in serial pancreata sections. Solid bars indicate mice not treated with Sulindac ($n = 3$). Open bars correspond to mice treated with Sulindac ($n = 3$). Data shown represent mean \pm SD. ** $p < 0.0037$, *** $p < 0.00012$.

See also Figure S6.

examined the expression of P16INK4a as a marker of senescence in samples obtained from pancreata of six patients with PDAC that also contained low-grade PanINs. Whereas none of the cells within the PDAC expressed detectable levels of this tumor suppressor, all six low-grade PanINs presented a very strong nuclear signal when probed with anti P16INK4a antibodies (Figure 8A). Parallel analysis of Ki67 staining, a marker for proliferation, revealed an inverse correlation with P16INK4a immunostaining (Figure 8C), an observation highly reminiscent of the results obtained in mice. These findings indicate that human low-grade PanINs also contain senescent cells.

Next, we examined the presence of senescent cells in PanINs present in surgically removed samples from nine patients suffering from chronic pancreatitis. The clinical histories of these patients are summarized in Table S1. To our surprise, low-grade PanINs were strongly positive for P16INK4a expression only in four of the nine samples (Figure 8B). Examination of the clinical history of these patients revealed that the four patients whose samples displayed senescence markers had received anti-inflammatory treatments. Whereas two of them had been treated

with prednisolone, the other two had received NSAIDs. In contrast, none of the five patients that lacked of P16INK4a expression had received anti-inflammatory therapy (Figure 8B; Figure S7). These pancreatitis-derived biopsies also displayed significant differences when they were analyzed for Ki67 expression. As illustrated in Figure 8C, PanINs present in biopsies derived from pancreatitis patients that have received anti-inflammatory treatment were essentially negative for Ki67. In contrast, those PanINs present in biopsies derived from untreated patients contained high levels of Ki67. These results strongly suggest that inhibition of the inflammatory response induced by pancreatitis helped to maintain senescence, possibly contributing to the clinical benefit provided by anti-inflammatory drugs.

DISCUSSION

Most cancers arise from somatic mutations during adulthood. Thus, proper understanding of how tumors are initiated requires modeling cancer in adult animals. In pancreas, the susceptibility to transformation by a resident *K-Ras* oncogene displayed by

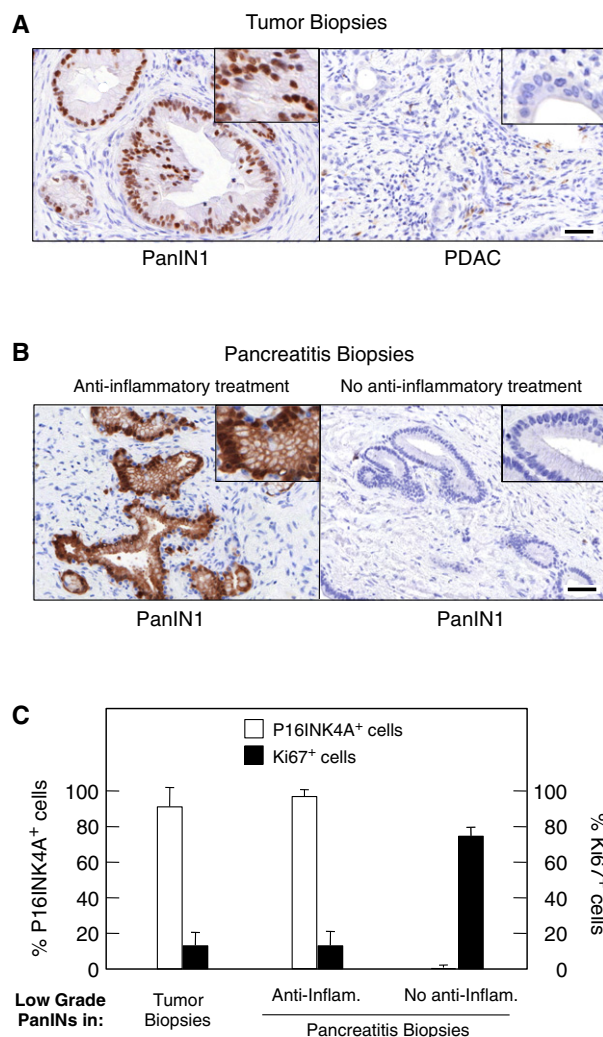


Figure 8. Senescence Markers in Human Low-Grade PanINs

(A) Low-grade PanINs present in biopsies from PDAC patients display senescence markers. (Left) Sections showing low-grade PanIN1s are positive for P16INK4a immunostaining. (Right) Sections depicting PDAC lesions are negative for P16INK4a immunostaining. Insets show amplified images to illustrate nuclear staining in PanIN1 lesions. Scale bar represents 50 μ m. (B and C) Antiinflammatory treatment restores senescence in low-grade PanIN of chronic pancreatitis patients. (B) P16INK4a immunostaining of biopsies obtained from patients suffering from chronic pancreatitis. (Left) Representative section displaying low-grade PanIN1s positive for P16INK4a staining present in a biopsy obtained from a patient treated with antiinflammatory drugs. (Right) Representative section displaying low-grade PanIN1s negative for P16INK4a staining present in a biopsy obtained from a patient not-treated with antiinflammatory drugs. Insets show amplified images to illustrate nuclear staining in PanIN1 lesions. Scale bar represents 50 μ m. (C) Quantification of the percentage of cells present in low-grade PanIN1 lesions positive for (open bars) P16INK4a immunostaining or (solid bars) Ki67 staining. Samples were obtained from (left) PDAC patients, (center) chronic pancreatitis patients treated with antiinflammatory drugs, and (right) chronic pancreatitis patients not treated with antiinflammatory drugs. Data shown represent mean \pm SD. See also Figure S7 and Table S1.

embryonic pancreatic precursors is lost in adult mice ($p \geq 60$) (Guerra et al., 2007). Indeed, the resistance of the adult pancreas to malignant transformation extends beyond K-Ras oncogenic

signaling. As illustrated here, adult acinar cells are also refractory to transformation by concomitant expression of a resident K-Ras oncogene and loss of the *p16Ink4a/p19Arf* or *Trp53* tumor suppressors, some of the most robust mutational events known in cancer.

In spite of their resistance to mutational insults, adult acinar cells retain their capacity to proliferate in response to certain pathological insults and to acquire tumorigenic properties (Slater et al., 1998; Jura et al., 2005). Exposure of adult mice to caerulein-induced pancreatitis induces proliferation of their acinar cells in order to repair tissue damage but does not result in formation of mPanINs or other preneoplastic lesions (Strobel et al., 2007). However, caerulein treatment restores permissiveness of adult acinar cells to malignant transformation by K-Ras oncogenes (Guerra et al., 2007; Gidekel Friedlander et al., 2009; Morris et al., 2010). Additional loss of the *p16Ink4a/p19Arf* or *Trp53* (unpublished results) tumor suppressors exacerbates the transformation process. Interestingly, pancreatitis does not cooperate with loss of either of these tumor suppressors. Thus, indicating that K-Ras oncogenes are essential for initiation of mPDAC.

mPDACs generated by a combination of oncogenic insults including K-Ras oncogenes, loss of *p16Ink4a/p19Arf* or *Trp53*, and caerulein-induced pancreatitis often display invasive and metastatic properties, albeit those induced in adult animals require longer latencies (Aguirre et al., 2003; Hingorani et al., 2005; Guerra et al., 2007). Moreover, a combination of K-Ras oncogenes and loss of *p16Ink4a/p19Arf* in early pancreatic precursors (Aguirre et al., 2003) or in embryonic acinar cells (this study) frequently result in anaplastic carcinomas, an aggressive tumor type seldom observed when these mutations are induced in adult animals. These results suggest that tumors that originate in the embryo develop more aggressively than those initiated during adulthood. Moreover, the more frequent occurrence of anaplastic carcinomas suggests that these oncogenic insults may engage pathways in embryonic acinar cells that are downregulated in their adult counterparts.

In humans, chronic pancreatitis represents one of the highest risk factors for developing PDAC (Lowenfels et al., 1993). However, most PDAC patients do not have a history of chronic pancreatitis. Thus, it is important to determine whether less aggressive forms of pancreatitis, including sporadic or even asymptomatic pancreatitis, may also increase the risk of developing PDAC. As illustrated here, limited bouts of mild pancreatitis lasting as little as 1 month were sufficient to elicit mPanIN formation, providing that the injured acinar cells expressed a K-Ras oncogene. Longer pancreatitis events resulted in increased incidence of mPanIN formation along with the appearance of high-grade mPanIN lesions and mPDAC with reduced latencies. The number and size of the lesions observed in these two protocols were considerably lower than those observed in mice suffering from chronic pancreatitis (Guerra et al., 2007). Finally, mPDAC can also develop if pancreatitis occurs before activation of K-Ras oncogenes, providing that tissue damage and the inflammatory response have not subsided. These observations raise the possibility that PDAC development in humans may also stem from limited bouts of pancreatitis providing that tissue repair and the inflammatory response coexist with sporadic K-Ras mutations.

Pancreatitis, most likely through its inflammatory component, contributes to mPanIN progression by abrogating OIS, a natural defense mechanism against tumor development (Collado and Serrano, 2010). Postmortem analysis of pancreatic tissue obtained from autopsies of healthy individuals has revealed the presence of PanIN lesions carrying *K-Ras* oncogenes that, presumably had not progressed to PDAC due to an active senescence program (Terhune et al., 1998; Lüttges et al., 1999; Löhr et al., 2005). Low-grade mPanIN lesions induced in the embryonic pancreas do not display senescence markers if the mice suffered from pancreatitis. In adult animals, which require pancreatitis for mPanIN development, senescence markers can only be detected once the inflammatory response has subsided. These observations suggest that one of the mechanisms by which pancreatitis-induced inflammation contributes to the progression of mPDAC is by eliminating the senescence barrier that prevents progression of low-grade mPanINs into more aggressive lesions.

In addition, the inflammatory response delays repair of the nontransformed pancreata and stimulate expansion of mPanIN lesions. Whether the latter effect is solely mediated by inhibiting senescence, remains to be determined. Animals treated with the dual COX-1/2 inhibitor Sulindac for 3 months after exposure to caerulein displayed almost normal pancreata with only few areas of atrophy and limited numbers of inflammatory cells. Whereas Sulindac had limited effect on the number of low-grade lesions, it caused a significant reduction (up to 75%) in the number of high-grade mPanINs and mPDAC. Yet, the most dramatic effect of this antiinflammatory treatment was observed on the extent of the area occupied by mPanIN lesions, which displayed a dramatic 95% reduction. These observations suggest that, in addition to eliminating the senescence barrier, the inflammatory response induced by episodic pancreatitis may contribute to mPDAC development by additional mechanisms.

How relevant are these observations to human patients? As illustrated in this study, low-grade PanINs present in samples surgically removed from PDAC patients displayed senescence markers. No such markers were observed in pancreatic tumor cells. Yet, the most informative observations correlating PanIN development with senescence came from the analysis of samples surgically removed from chronic pancreatitis patients. Although the number of samples analyzed is still small, we found an intriguing correlation between the occurrence of senescence in low-grade PanINs and prior exposure of the patients to antiinflammatory agents. The results were independent of whether the antiinflammatory treatment was based on steroids or on NSAIDs. These observations suggest that pancreatitis patients may benefit from antiinflammatory treatments by retaining the senescent phenotype in their low-grade PanIN lesions, possibly preventing their progression into high-grade lesions.

K-RAS mutations have been identified in the pancreas of healthy individuals (Terhune et al., 1998; Lüttges et al., 1999; Löhr et al., 2005). In addition, patients with chronic pancreatitis have over 10-fold increased risk of developing PDAC (Lowenfels et al., 1993; Malka et al., 2002). As illustrated in this study, mPDAC develop in adult mice expressing a resident *K-Ras* oncogene if they undergo episodic events of pancreatitis, even under asymptomatic conditions. These observations raise the possibility that in humans, at least some PDACs may originate

from mild bouts of pancreatitis in individuals that unknowingly carry *K-RAS* mutations. Because the identification of *K-RAS* oncogene containing cells within the pancreas of healthy individuals is not possible, it will be important to monitor people that have been diagnosed with pancreatitis for the development of pancreatic lesions, that if unattended may lead to PDAC. Likewise, it will be important to develop biomarkers that can identify individuals that have suffered from asymptomatic pancreatitis, at least in high-risk populations.

The correlation between inflammation and loss of OIS also has important implications for the prevention of PDAC development. Treatment with antiinflammatory drugs maintained senescence markers in low-grade PanINs present in chronic pancreatitis patients. Interestingly, recent epidemiological studies have suggested a beneficial correlation between NSAIDs and pancreatic cancer risk (Bonifazi et al., 2010; Bradley et al., 2010; Rothwell et al., 2011). Our results suggest that antiinflammatory treatments might decrease the risk of PDAC development by maintaining the senescence phenotype of early PanIN lesions. Now, it will be necessary to determine whether inhibition of the inflammatory response will have a beneficial response in patients already carrying fully developed PDAC. The mouse models utilized here should contribute to address this question.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

K-Ras^{tr/LSLG12V}G^{eo}, *Ela*s-tTA/tetO-Cre (Guerra et al., 2007), *p16Ink4a*/p19Arf^{lox/lox} (Krimpenfort et al., 2001), and *Trp53^{lox/lox}* (Jonkers et al., 2001) strains have been described. All experiments were approved by the CNIO Ethical Committee and performed in accordance with the guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals as stated in The International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals, developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS).

Human Samples

Human samples were obtained from the histopathology files of University College Hospital from patients who had undergone pancreatoduodenectomy, distal pancreatectomy or total pancreatectomy with a primary diagnosis of chronic pancreatitis or ductal adenocarcinoma from 2004 to 2008 after approval by the institutional Research Ethics Committee (Central London REC 3, Reference 06/Q0512/106) and informed consent was obtained from all patients.

Histopathology and Immunohistochemistry

Specimens were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. For histopathological analysis, pancreata were serially sectioned (3 μ m) and every 10 sections stained with hematoxylin and eosin. Remaining sections were kept for immunohistochemical studies. Antibodies used for mouse samples include CD3 (1/250, goat polyclonal, Santa Cruz 1127), Cytokeratin19 (rat monoclonal, Troma III, Developmental Studies Hybridoma Bank), Chymotrypsin (1/50, mouse monoclonal 4E1, ABD Serotec, 2100-0657), Elastase (1/50, rabbit polyclonal, ABCAM, ab21590), F4/80 (1/25, rat monoclonal BM8, BMA Biomedicals), Ki67 (prediluted rabbit monoclonal SP6, Master Diagnostica 0003110QD), MPO (1/1250, rabbit polyclonal, DAKO A0398), PAI-1 (1/50, rabbit polyclonal, Santa Cruz sc-8979), Pax5 (1/500, goat polyclonal, Santa Cruz 1974), phospho-Histone H3-Ser10 (1/200, rabbit polyclonal, MILLIPORE 06-570), prosurfactant protein C (SPC) (1/50, rabbit polyclonal, MILLIPORE AB3786), p16Ink4a (1/75, rabbit polyclonal, Santa Cruz 1207), Sox9 (1/800, rabbit polyclonal, MILLIPORE AB5535), and Sprouty-4 (1/50, goat polyclonal, Santa Cruz 18607) antibodies. Antibodies against Pdx1 were kindly provided by A. Skoudy. Positive cells were visualized using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride plus (DAB+) as a chromogen. For human samples, P16INK4a

immunolabeling was performed according to the manufacturer's protocol (CINtec Histology Kit, mtrmlabs, Heidelberg, Germany). Ki67 staining was performed with mouse monoclonal Anti-Human Ki-67 (Dako).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, seven figures and one table and can be found with this article online at doi:10.1016/j.ccr.2011.05.011.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Aragón, M. Lamparero, M. Lozano, E. Martínez, M. San Román, and R. Villar for excellent technical assistance. We also value the excellent support provided by V. Alvarez, E. Gil, M. Gómez, P. González, and N. Matesanz with histopathology. We thank A. Skoudy (IMIM, Barcelona) for providing the Pdx1 antibody, J.I. Gordon (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO) for providing the tetO-PhCMV-Cre mice and Paul Grippio (Northwestern University, Chicago, IL), and Eric Sandgren (University of Wisconsin, Madison, WI) for providing the *Elastase*-tTA strain. Work in the laboratory of M.B. was supported by grants from the EU-Framework Programme (LSHG-CT-2007-037665), European Research Council (ERC-AG/250297-RAS AHEAD), Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) (SAF2006-11773 and CSD2007-00017), Autonomous Community of Madrid (GR/SAL/0587/2004 and S2006/BIO-0232) and *Fundación de la Mutua Madrileña del Automovil* to M.B. and by grants from *Fondo de Investigación Sanitaria* (PI042124) and Autonomous Community of Madrid (GR/SAL/0349/2004) to C.G. Work in the laboratory of M.S. was funded by grants from the EU-Framework Programme (PROTEOMAGE), European Research Council (ERC-AG/233270), MICINN (SAF2008-02959 and CSD2007-00017), and the *Marcelino Botín* Foundation. M.R.-J. is supported by the UCLH/UCL Comprehensive Biomedical Research Centre (London, UK). M.C. is the recipient of a "Ramon y Cajal" contract from the MICINN.

Received: September 22, 2010

Revised: January 19, 2011

Accepted: May 13, 2011

Published: June 13, 2011

REFERENCES

- Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., and DePinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 17, 3112–3126.
- Bardeesy, N., Cheng, K.H., Berger, J.H., Chu, G.C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A.F., Horner, J., Lauwers, G.Y., Hanahan, D., and DePinho, R.A. (2006). Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* 20, 3130–3146.
- Bonifazi, M., Gallus, S., Bosetti, C., Polesel, J., Serrano, D., Talamini, R., Negri, E., and La Vecchia, C. (2010). Aspirin use and pancreatic cancer risk. *Eur. J. Cancer Prev.* 19, 352–354.
- Bradley, M.C., Hughes, C.M., Cantwell, M.M., Napolitano, G., and Murray, L.J. (2010). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pancreatic cancer risk: a nested case–control study. *Br. J. Cancer* 102, 1415–1421.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* 10, 51–57.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- De La O, J.P., Emerson, L.L., Goodman, J.L., Froebe, S.C., Illuma, B.E., Curtisa, A.B., and Murtaugh, L.C. (2008). Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18907–18912.
- Fendrich, V., Esni, F., Garay, M.V., Feldmann, G., Habbe, N., Jensen, J.N., Dor, Y., Stoffers, D., Jensen, J., Leach, S.D., and Maitra, A. (2008). Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology* 135, 621–631.
- Gidekel Friedlander, S.Y., Chu, G.C., Snyder, E.L., Girmius, N., Dibelius, G., Crowley, D., Vasile, E., DePinho, R.A., and Jacks, T. (2009). Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* 16, 379–389.
- Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippio, P.J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., and Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11, 291–302.
- Habbe, N., Shi, G., Meguid, R.A., Fendrich, V., Esni, F., Chen, H., Feldmann, G., Stoffers, D.A., Konieczny, S.F., Leach, S.D., and Maitra, A. (2008). Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18913–18918.
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 362, 1605–1617.
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450.
- Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramandt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., and Tuveson, D. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469–483.
- Hruban, R.H., and Adsay, N.V. (2009). Molecular classification of neoplasms of the pancreas. *Hum. Pathol.* 40, 612–623.
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Anver, M.R., Biankin, A.V., Boivin, G.P., Furth, E.E., Furukawa, T., Klein, A., Klimstra, D.S., et al. (2006). Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res.* 66, 95–106.
- Ijichi, H., Chytil, A., Gorska, A.E., Aakre, M.E., Fujitani, Y., Fujitani, S., Wright, C.V., and Moses, H.L. (2006). Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev.* 20, 3147–3160.
- Jensen, J.N., Cameron, E., Garay, M.V., Starkey, T.W., Gianani, R., and Jensen, J. (2005). Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128, 728–741.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801–1806.
- Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M., and Berns, A. (2001). Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat. Genet.* 29, 418–425.
- Jura, N., Archer, H., and Bar-Sagi, D. (2005). Chronic pancreatitis, pancreatic adenocarcinoma and the black box in-between. *Cell Res.* 15, 72–77.
- Krimpenfort, P., Quon, K.C., Mooi, W.J., Loonstra, A., and Berns, A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 413, 83–86.
- Löhr, M., Klöppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B., and Lüttges, J. (2005). Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 7, 17–23.
- Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R.W., Lankisch, P.G., Andersen, J.R., Dimagno, E.P., Andrén-Sandberg, A., and Domellöf, L. (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N. Engl. J. Med.* 328, 1433–1437.
- Lüttges, J., Schlehe, B., Menke, M.A., Vogel, I., Henne-Bruns, D., and Klöppel, G. (1999). The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium. *Cancer* 85, 1703–1710.

- Malka, D., Hammel, P., Maire, F., Rufat, P., Madeira, I., Pessione, F., Lévy, P., and Ruzsiewicz, P. (2002). Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 51, 849–852.
- Morris, J.P., 4th, Cano, D.A., Sekine, S., Wang, S.C., and Hebrok, M. (2010). Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 508–520.
- Pasca di Magliano, M., Sekine, S., Ermilov, A., Ferris, J., Dlugosz, A.A., and Hebrok, M. (2006). Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev.* 20, 3161–3173.
- Rothwell, P.M., Fowkes, F.G.R., Belch, J.F.F., Ogawa, H., Warlow, Ch.P., and Meade, T.W. (2011). Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 377, 31–41.
- Seymour, P.A., Freude, K.K., Tran, M.N., Mayes, E.E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., and Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1865–1870.
- Slater, S.D., Williamson, R.C., and Foster, C.S. (1998). Proliferation of parenchymal epithelial cells enhanced in chronic pancreatitis. *J. Pathol.* 186, 104–108.
- Smith, W.L., Meade, E.A., and Hewitt, D.L. (1994). Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. *Ann. N Y Acad. Sci.* 714, 136–142.
- Strobel, O., Dor, Y., Alsina, J., Stirman, A., Lauwers, G., Trainor, A., Fernández-Del Castillo, C., Warshaw, A.L., and Thayer, S.P. (2007). In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology* 133, 1999–2009.
- Tanaka, H., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Alexander, D.B., Long, N., Tamamushi, S., Kohtaro, M., Susumu, S., Hirotaka, O., Takashi, J., and Hiroyuki, T. (2010). Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in rats. *Cancer Sci.* 101, 341–346.
- Terhune, P.G., Phifer, D.M., Tosteson, T.D., and Longnecker, D.S. (1998). K-ras mutations in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 515–521.
- Yoshida, T., Nobuaki Shiraki, N., Baba, H., Goto, M., Fujiwara, S., Kume, K., and Kume, S. (2008). Expression patterns of epiplakin in pancreas, pancreatic cancer and regenerating pancreas. *Genes Cells* 13, 667–678.

EGF Receptor Signaling Is Essential for K-Ras Oncogene-Driven Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

Carolina Navas,¹ Isabel Hernández-Porras,¹ Alberto J. Schuhmacher,^{1,3} Maria Sibilia,² Carmen Guerra,^{1,*} and Mariano Barbacid^{1,*}

¹Molecular Oncology Programme, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), E-28029 Madrid, Spain

²Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Comprehensive Cancer Center, Medical University of Vienna, Borschkegasse 8a, A1090 Vienna, Austria

³Present address: Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021, USA

*Correspondence: mcguerra@cnio.es (C.G.), mbarbacid@cnio.es (M.B.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.001>

SUMMARY

Clinical evidence indicates that mutation/activation of EGF receptors (EGFRs) is mutually exclusive with the presence of K-RAS oncogenes in lung and colon tumors. We have validated these observations using genetically engineered mouse models. However, development of pancreatic ductal adenocarcinomas driven by K-Ras oncogenes are totally dependent on EGFR signaling. Similar results were obtained using human pancreatic tumor cell lines. EGFRs were also essential even in the context of pancreatic injury and absence of p16Ink4a/p19Arf. Only loss of p53 made pancreatic tumors independent of EGFR signaling. Additional inhibition of PI3K and STAT3 effectively prevented proliferation of explants derived from these p53-defective pancreatic tumors. These findings may provide the bases for more rational approaches to treat pancreatic tumors in the clinic.

INTRODUCTION

Patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) have an average survival of less than a year with fewer than 5% surviving more than 5 years (Vincent et al., 2011). Current standard of care for PDAC patients is Gemcitabine, a nucleoside analog that only prolongs survival for few weeks (Burris et al., 1997; Li et al., 2004). Hence, there is an urgent medical need to find more effective therapeutic approaches to treat this deadly disease (Hidalgo, 2010).

PDAC is likely to stem from a process known as acinar to ductal metaplasia that involves either transdifferentiation of adult acinar cells or misdifferentiation of their progenitors into ductal-like cells. These cells can subsequently progress into malignant adenocarcinoma through a series of histopathological lesions known as pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) (Maitra and Hruban, 2008). Early pancreatic lesions

including low-grade PanINs already carry mutations in K-RAS oncogenes, along with loss or inactivation of the *P16INK4a* tumor suppressor (Kanda et al., 2012). High-grade lesions develop upon accumulation of further mutational events, mainly involving inactivation of other tumor suppressors such as *TP53*, *SMAD4*, or *BRCA2* (Hong et al., 2011). Exome sequencing analysis of PDAC genomes has revealed an incredibly complex pattern of mutations affecting as many as 12 different signaling pathways (Jones et al., 2008). In a recent study describing the exomic sequence of different areas of a single PDAC tumor, Campbell et al. (2010) have illustrated the perverse molecular evolution of these tumors even before they spread to other organs.

In 2007, a clinical trial combining Gemcitabine with the EGFR inhibitor, Erlotinib, reported some responses in a limited number of PDAC patients (Moore et al., 2007). Yet, the overall results were not sufficiently significant for the FDA to recommend the

Significance

Previous clinical studies have suggested a therapeutic benefit of Erlotinib, an EGFR inhibitor, in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. Here, we show that these observations may have a mechanistic base. EGFRs are expressed during pancreatic injury and in preneoplastic PanIN lesions. Loss of p53, but not of p16INK4a/p19ARF tumor suppressors, relieved the need of tumor cells to maintain EGFR signaling. Yet, loss of EGFRs increased tumor latency and survival. Tumor explants lacking p53 and EGFRs were sensitive to the combined inhibition of PI3K and STAT3. Thus, successful treatment of advanced human pancreatic tumors may require inhibition of at least four distinct signaling cascades including those driven by K-RAS, EGFRs, PI3K, and STAT3.

combination of these two drugs as standard of care. These observations are intriguing because the EGFR is known to signal upstream of K-RAS and hence, its inhibition should have little or no effect on downstream K-RAS-driven oncogenic signals (Yarden and Sliwkowski, 2001). Indeed, in nonsmall lung adenocarcinoma (NSCLC) mutations in *EGFR* and in K-RAS are mutually exclusive (Shigematsu et al., 2005). Likewise, a large clinical trial carried out in patients with advanced colorectal carcinomas (CRC) has determined that patients carrying tumors with K-RAS mutations do not benefit from treatment with Cetuximab, a monoclonal antibody that blocks EGFR signaling (Karapetis et al., 2008). In spite of these odds, we decided to interrogate by genetic means whether EGFRs might play a role in K-Ras oncogene-driven PDAC using a well-characterized genetically engineered mouse (GEM) model for this disease (Guerra et al., 2007, 2011).

RESULTS

Acinar to Ductal Metaplasia Requires EGFR Signaling Even in the Presence of K-Ras Oncogenes

Pancreatic acinar to ductal metaplasia is a precursor of the preneoplastic PanIN lesions that eventually lead to PDAC development (Parsa et al., 1985). In normal mice, generation of acinar to ductal metaplasia is largely dependent on activation of EGFRs (Means et al., 2005). Because EGFRs signal through the Ras pathway, we examined whether expression of a constitutive active K-Ras oncoprotein could bypass the requirement for EGFR activity during the generation of metaplasia. Pancreatic cell explants obtained from *K-Ras*^{+/LSLG12V^{geo}}*Elas*-tTA/*tetO*-Cre mice (from now on *ElasK-Ras*^{G12V}) in which the *K-Ras*^{G12V} oncogene is selectively expressed in acinar cells, efficiently transdifferentiated into metaplastic ductal-like cells leading to the generation of 5- to 10-fold more metaplastic structures than those not expressing the oncogene (Figure S1A available online). Yet, *K-Ras*^{G12V}-driven metaplasia was still largely dependent on activation of EGFRs because addition of their cognate ligands EGF or TGF α , effectively increased the number of metaplastic figures (Figure S1B). Ablation of *Egfr* alleles significantly reduced, but did not eliminate the ability of acinar cell explants to generate metaplastic structures (Figures S1B–S1D). These observations suggest that EGF and TGF α may contribute to acinar to ductal metaplasia by activating additional receptors, at least in vitro. Pancreatic acinar cells also expressed high levels of amphiregulin, but not of other members of the EGFR family of ligands (Figure S1E).

Human and Mouse Pancreatic Lesions Express Abundant EGFRs

Mouse acinar cells did not express detectable levels of EGFRs regardless of whether they expressed a K-Ras oncogene or not (Figure 1A). In contrast, PanINs, regardless of their grade, were decorated with high levels of the receptor (Figure 1A) (Ueda et al., 2004; Hingorani et al., 2005). Elevated expression of EGFRs was maintained during tumor progression including well-differentiated glandular structures within PDAC tumors (Figure 1A). However, expression levels decreased in poorly differentiated tumor cells (Figure 1B) (Ueda et al., 2004; Hingorani et al., 2005). Human normal pancreata also displayed undetect-

able levels of EGFRs (Figure 1C). However, morphologically normal acinar cells of pancreatitis patients expressed significant levels of EGFRs in a manner highly reminiscent of the result obtained in pancreata derived from mice exposed to caerulein (Figures 1B and 1C).

These observations are in agreement with an early study describing overexpression of EGFRs in patients with chronic pancreatitis (Korc et al., 1994). We also observed that metaplasias present in pancreatitis biopsies displayed elevated levels of EGFRs (Figure 1C). Low-grade and high-grade PanINs present in human PDAC tumors also expressed high levels of EGFRs (Figure 1C). Interestingly, their pattern of expression in tumored areas closely resembled that observed in mouse PDACs (Figure 1B). Whereas well-differentiated tumor glands were uniformly decorated with EGFR antibodies, less-differentiated glands expressed significantly lower levels of the receptors (Figure 1C). Finally, metastatic cells localized in a regional lymph node retained detectable, albeit somewhat attenuated levels of EGFRs (Figure 1C). These observations indicate that induction of EGFRs in acinar cells of injured pancreata as well as in PanIN and PDAC lesions is a common event in mouse and human pancreatic tissues.

EGFRs Are Essential for the Generation of K-Ras Oncogene-Driven PanIN Lesions

To determine whether development of PanIN lesions and PDAC tumors require EGFR signaling, we generated *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{+/+} and *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{lox/lox} strains and analyzed their pancreata at 1 year of age. These mice were not exposed to doxycycline to allow expression of the *Elastase*-driven Cre recombinase during late embryonic development (E16.5). Cre-mediated recombination allowed concomitant expression of the resident *K-Ras*^{G12V} oncogene and ablation of the floxed *Egfr* alleles in acinar cells (Figure S2A). As illustrated in Figure 2A, control *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{+/+} littermates (12 out of 13 animals, 92%) exhibited abundant low- and high-grade PanIN lesions (average of 16 and 5 lesions per pancreata, respectively). Moreover, three animals (23%) displayed sizable PDAC tumors. Animals heterozygous for the *Egfr* locus also harbored low- and high-grade PanIN lesions albeit at reduced numbers (average of 5 and 2.5 lesions per pancreata, respectively). Likewise, only one out of ten heterozygous mice carried a PDAC tumor (Figure 2A).

In contrast, careful analysis of serial sections of pancreata from 1-year-old *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{lox/lox} animals (n = 24) only revealed the presence of a limited number of PanIN lesions (ten low-grade and two high-grade PanINs) in eight mice. More importantly, all of these lesions expressed EGFRs due to incomplete recombination of the floxed *Egfr* alleles (Figures S2B and S2C). Similar results were obtained in older mice sacrificed at 2 years of age (data not shown). These observations indicate that EGFRs are essential for the induction of PanINs and PDAC by K-Ras oncogenes.

Adult Mice Also Require EGFR Signaling for PDAC Development

To exclude the possibility that these observations were due to developmental defects in acinar cells lacking EGFRs during embryonic development, we exposed *ElasK-Ras*^{G12V}; *Egfr*^{+/+}

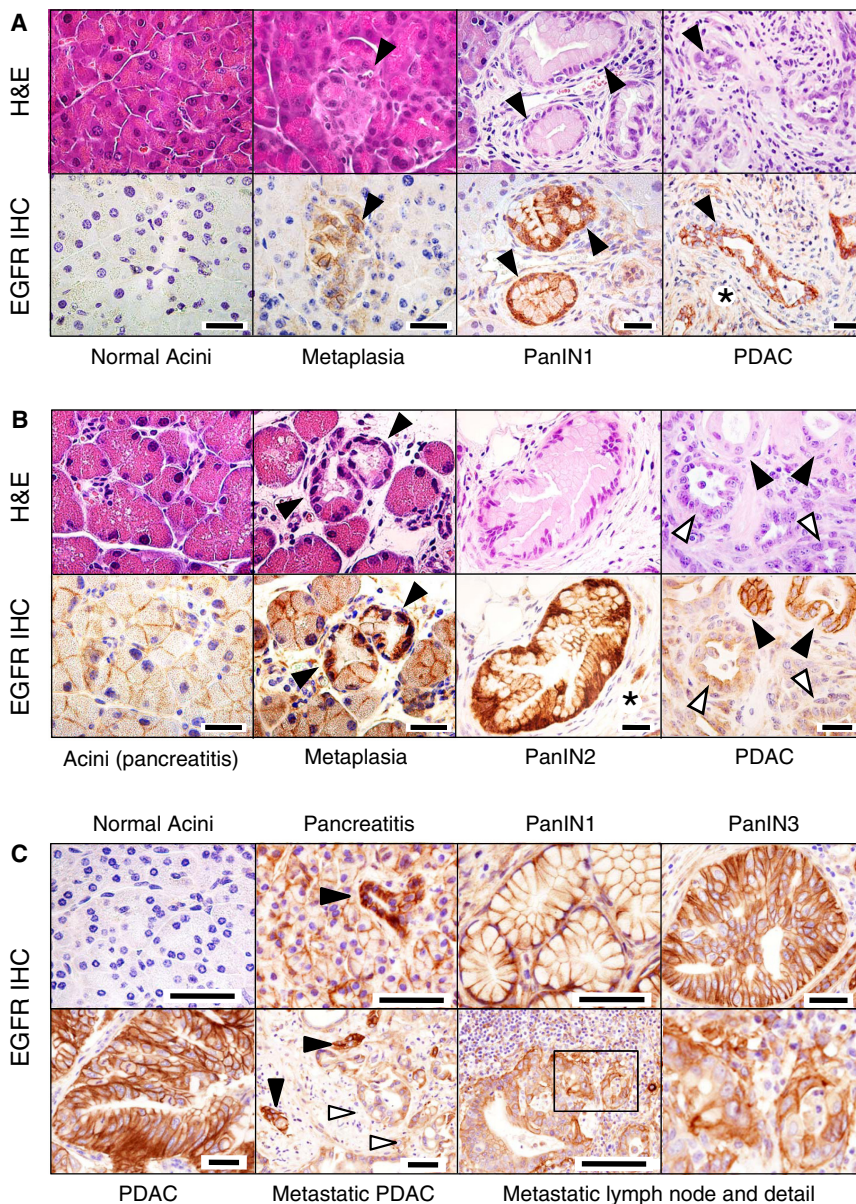


Figure 1. Expression of EGFR in Pancreas of *Elask-Ras*^{G12V} Mice and of Patients with Pancreatitis and PDAC

(A) Serial paraffin sections obtained from *Elask-Ras*^{G12V} mice not exposed to doxycycline depicting normal acini, acinar to ductal metaplasia, PanIN1, and PDAC were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or with antibodies against the EGFR (EGFR IHC). Lesions are indicated by solid arrowheads. Asterisk indicates stroma cells positive for EGFR immunostaining. Scale bars represent 20 μ m.

(B) Serial paraffin sections obtained from *Elask-Ras*^{G12V} mice exposed to doxycycline from conception to P60 and to caerulein from P90 to P180 depicting acini, acinar to ductal metaplasia, PanIN2 and PDAC were stained with H&E or with antibodies against the EGFR (EGFR IHC). Lesions are indicated by solid arrowheads. Open arrowheads indicate less-differentiated glands within a PDAC. Asterisk indicates stroma cells positive for EGFR expression. Scale bars represent 20 μ m.

(C) EGFR IHC of human pancreatic biopsies depicting normal pancreata, pancreata from patients with pancreatitis, PanIN lesions (PanIN1 and PanIN3), nonmetastatic PDAC and a metastatic lymph node with amplified detail. Lesions are indicated by solid arrowheads. Open arrowheads indicate less-differentiated glands within the metastatic PDAC. Scale bars represent 50 μ m. See also Figure S1.

and *Elask-Ras*^{G12V};*Egfr*^{lox/lox} littermates to doxycycline from conception until adulthood (8 weeks of age) to prevent expression of the Cre recombinase. As previously reported, induction of PanIN lesions in these mice requires a pancreatic insult (Guerra et al., 2007). Analysis of 14-month-old *Elask-Ras*^{G12V};*Egfr*^{lox/lox} mice (n = 14) treated with caerulein for 3 months (P90–P180), that is, 1 year after turning on expression of the resident K-Ras^{G12V} oncogene, revealed complete absence of EGFR positive low- and high-grade PanIN lesions or PDAC tumors (Figure 2B). Only three mice carried PanIN lesions, all of which expressed EGFRs (data not shown). Mice examined at 2 years of age displayed a total of nine low-grade and three high-grade PanIN lesions in three out of the seven mice analyzed, all of which retained EGFR expression (data not shown).

As summarized in Figure 2B, control *Elask-Ras*^{G12V};*Egfr*^{+/+} littermates exhibited the expected number of lesions (Guerra

et al., 2011). All mice (n = 13) developed low-grade PanINs (average of 18 lesions per pancreata) and more than 90% (12 out of 13) displayed high-grade PanINs (average of 16 lesions per pancreata). Only one mouse out of 13 (8%) had a full-blown PDAC tumor (Figure 2B). Ablation of a single *Egfr* allele yielded similar results regarding the number of mice affected (80% of the animals carried PanIN lesions and 10% a PDAC tumor). However, the average number of lesions per pancreata was significantly lower

(Figure 2B). These observations strongly support the concept that initiation of PDAC tumors requires at least two independent signaling inputs mediated by the EGFR and the K-Ras oncoprotein.

EGFRs Cooperate with Resident K-Ras Oncogenes by Activating AKT and STAT3 Signaling Pathways

In an attempt to shed light on the mechanism by which the EGFR cooperate with the resident K-Ras^{G12V} oncoprotein to induce pancreatic lesions, we examined the status of AKT, a well-known downstream effector of the PI3K/AKT survival pathway and STAT3, a mediator of inflammatory cytokines that has been recently implicated in PDAC development (Corcoran et al., 2011; Fukuda et al., 2011; Lesina et al., 2011). As illustrated in Figure S2D, pancreata of untreated *Elask-Ras*^{G12V} mice display acinar cells that do not express either EGFR or detectable levels

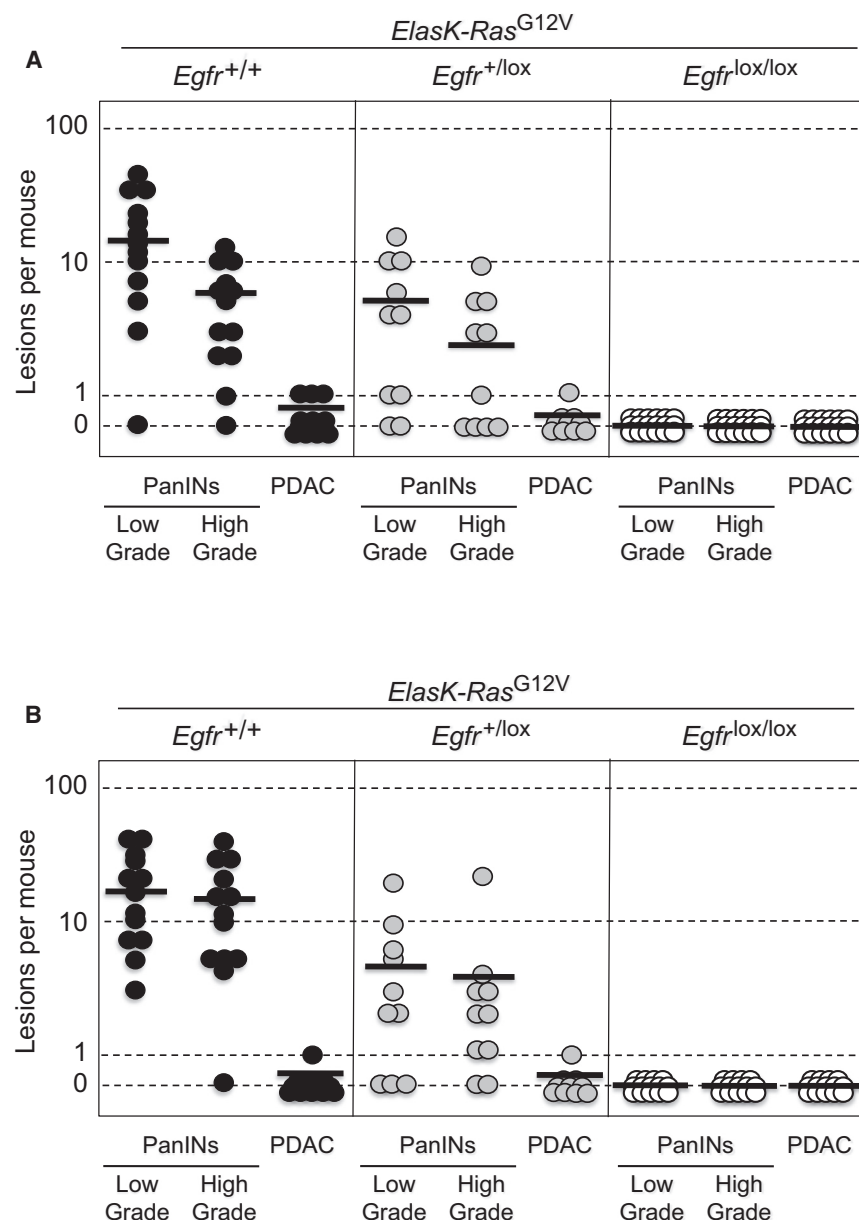


Figure 2. Induction of PanINs and PDAC Tumors by an Endogenous K-Ras^{G12V} Oncogene Requires Expression of the EGFR

(A) Number of low- and high-grade PanINs and PDACs per mouse in untreated, 1-year-old *ElasK-Ras^{G12V}* mice carrying the indicated *Egfr* alleles. *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}* (solid circles), *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/lox}* (gray circles), and *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* (open circles) mice. In these mice, Cre recombinase-mediated expression of the endogenous K-Ras^{G12V} oncogene and ablation of the conditional *Egfr^{lox}* alleles took place in a percentage (30%) of acinar cells during late embryonic development.

(B) Number of low- and high-grade PanINs and PDACs per mouse in 14-month-old *ElasK-Ras^{G12V}* mice carrying the indicated *Egfr* alleles. *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}* (solid circles), *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{+/lox}* (gray circles), and *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* (open circles) mice. These mice were exposed to doxycycline from conception to P60, a time at which Cre recombinase-mediated expression led to the concomitant activation of the resident K-Ras^{G12V} oncogene and ablation of the conditional *Egfr^{lox}* alleles in acinar cells. Mice were subsequently treated with caerulein from P90 to P180.

Horizontal bars indicate the average number of lesions per mouse for each genotype. See also Figure S2.

phospho-STAT3 in PDAC tumors also suggests that activation of these effector molecules might be required for tumor progression (data not shown).

Human Pancreatic Ductal Tumor Cell Lines Are Dependent on EGFR Signaling Regardless of the Presence of K-RAS Oncogenes

Next, we interrogated whether cell lines derived from human PDACs also depend on EGFR signaling for proliferation. We selected eight well-characterized tumor cell lines with different pattern of mutations. Six of them, AsPc1, CFPAC, IMIMPC-2, MIAPaCa, PANC1, and SKPC, harbor K-RAS oncogenes along with inactivation of *P16INK4a* and *TP53* tumors suppressor genes (Table 1). CFPAC and SKPC cells also have a deleted *SMAD4* locus. The remaining pancreatic tumor cell lines BxPc3 and T3M4, carry a wild-type K-RAS locus. Yet, they also have mutated or silenced *P16INK4a* and *TP53* loci and one of them, BxPc3, a mutated *SMAD4* locus (Table 1). Knockdown of EGFRs using two independent shRNAs efficiently inhibited proliferation (>70%) of AsPc1, BxPc3, MIAPaCa, and T3M4 cells. Two cell lines, PANC1 and IMIMPC-2, were only partially inhibited whereas the remaining cell lines, CFPAC and SKPC, were resistant (Table 1). Thus, the effect of EGFR signaling on proliferation appears to be independent of the presence of K-RAS oncogenes. Knockdown of EGFR expression only inhibited the PI3K pathway, as determined by

of phosphorylated AKT or STAT3. Thus indicating that expression of the resident K-Ras^{G12V} oncoprotein does not activate these pathways, at least in this cellular context. In contrast, pancreata of *ElasK-Ras^{G12V}* mice treated with caerulein for 3 months exhibit uniform expression of EGFRs along with nuclear phospho-AKT and phospho-STAT3 proteins through the entire pancreas. Since K-Ras^{G12V} expression in these mice only takes place in about 30% of their acinar cells, activation of the EGFR/AKT/STAT3 axis must be independent of K-Ras oncogene signaling (Guerra et al., 2007, 2011). As expected, pancreatic lesions including metaplasias and PanINs, also display activated phospho-AKT and phospho-STAT3 molecules in response to EGFR expression, suggesting that activation of the PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways play a role in the induction of these lesions (Figure S2E). Finally, the presence of nuclear phospho-AKT and

Table 1. Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Lines Are Sensitive to Inhibition of EGFR and MEK Signaling

Tumor	Mutation				EGFR Knockdown % Inhibition	Treatment			
	K-RAS	P16INK4a	TP53	SMAD4		Erlotinib IC ₅₀	Erlotinib IC ₉₀	PD325901 IC ₅₀	PD325901 IC ₉₀
AsPc1	G12D	Frameshift	Frameshift	WT	72.3	>200.0 μ M	>200 μ M	190.0 μ M	>200 μ M
CFPAC	G12V	Methylated	Mutation	Deletion	5.2	20.0 μ M	>200 μ M	22.5 μ M	>200 μ M
IMIMPC-2	G12D	Deletion	Mutation	WT	32.5	>200.0 μ M	>200 μ M	0.8 μ M	>200 μ M
MIAPaCa	G12C	Deletion	Mutation	WT	97.0	66.8 μ M	>200 μ M	8.5 μ M	>200 μ M
PANC1	G12D	Deletion	Mutation	WT	59.9	>200.0 μ M	>200 μ M	>200.0 μ M	>200 μ M
SKPC	G12V	Methylated	Mutation	Deletion	08.7	70.0 μ M	>200 μ M	0.5 μ M	>200 μ M
BxPc3	WT	Mutation	Mutation	Mutation	81.0	23.5 μ M	>200 μ M	0.3 μ M	>200 μ M
T3M4	WT	Methylated	Mutation	WT	90.1	12.2 μ M	>200 μ M	0.1 μ M	>200 μ M

WT, wild-type. See also Figure S3.

phosphorylation of AKT, in those cells carrying a wild-type K-RAS locus (Figure S3).

Five of these tumor cell lines, including K-RAS oncogene-positive CFPAC, MiaPaCa and SKPC cells, and K-RAS oncogene-negative BxPc3 and T3M4 cells were partially sensitive to Erlotinib (Table 1). Erlotinib treatment did not result in complete inhibition of cell proliferation (IC₉₀) even at concentrations as high as 200 μ M. The SKPC cell line, whereas partially sensitive to Erlotinib, was refractory to EGFR knockdown (Table 1). This discrepancy might be explained by either the inability of the shRNAs to effectively knockdown the high levels of EGFRs present in this cell line or to the off-target effect of Erlotinib on related tyrosine protein kinase receptors (Figure S3). We also examined the effect of directly inhibiting the RAS pathway by using the MEK inhibitor, PD325901. Four cell lines carrying K-RAS oncogenes, CFPAC, IMIMPC-2, MiaPaCa, and SKPC cells were sensitive to this inhibitor. Interestingly, the BxPc3 and T3M4 cell lines that have a wild-type K-RAS locus, were also highly sensitive to the MEK inhibitor, suggesting that these cells may have activated their RAS pathway by mechanisms other than mutating their K-RAS locus (Table 1). Finally, AsPc1 and PANC1 cells were resistant to MEK inhibition in spite of carrying K-RAS oncogenes, suggesting that in these cells K-RAS oncogenes may no longer play an essential role in maintaining their proliferative properties (Table 1).

K-RAS^{G12V}-Driven Lung and Intestinal Tumors Do Not Require EGFR Signaling

The above results, taken together, indicate that proliferation of pancreatic ductal tumor cells have a dual requirement for EGFR and K-RAS signaling. These observations are at odds with extensive clinical data in human NSCLCs, in which oncogenic mutations in the *EGFR* and K-RAS loci are mutually exclusive (Shigematsu et al., 2005). Likewise, CRC patients carrying K-RAS oncogenes do not benefit from treatments involving inhibition of EGFR signaling (Karapetis et al., 2008). To determine whether the results described above only occur in the context of mouse tumor models or are an intrinsic property of pancreatic tumors, we ablated the *Egfr* locus in two well-characterized GEM models of lung and intestinal tumors induced by the same endogenous K-Ras^{G12V} oncogene used to initiate pancreatic lesions. In these models, expression of the resident K-Ras^{G12V} oncogene is mediated by activation of an ubiquitously expressed

Cre-ERT2 inducible recombinase knocked-in at the locus encoding the large subunit of RNA polymerase II (*RERT* strain; see Guerra et al., 2003). For the lung model, *RERT*;K-Ras^{G12V}; *Egfr*^{+/+} (n = 17), *RERT*;K-Ras^{G12V}; *Egfr*^{+/-lox} (n = 13), and *RERT*;K-Ras^{G12V}; *Egfr*^{lox/lox} (n = 25) littermates were treated at weaning with a single dose of 4-hydroxy-tamoxifen (4OHT) (Guerra et al., 2003; Puyol et al., 2010). As illustrated in Figure 3A, all mice died of lung tumors between 63 and 72 weeks of age. Mice displayed similar number of adenomas (average of 15 per mouse) and adenocarcinomas (average of three per mouse) regardless of genotype. None of the tumors analyzed expressed EGFRs by IHC analysis (Figure 3B). Moreover, PCR analysis of tumor DNA only revealed recombined *Egfr* null alleles (data not shown), thus indicating that tumor development had occurred in the absence of EGFRs.

Similar results were obtained in a GEM model of intestinal tumors. *RERT*;K-Ras^{G12V}; *Apc*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} mice (n = 16) along with control *RERT*;K-Ras^{G12V}; *Apc*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/-lox} (n = 17) and *RERT*;K-Ras^{G12V}; *Apc*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/+} (n = 7) littermates were treated at weaning for 2 weeks (3 days per week) with 4OHT. These mice displayed similar tumor burden including adenomas and adenocarcinomas (data not shown) and did not survive beyond 20 weeks of age (Figure 3C). As expected, tumor cells, regardless of genotype, failed to express EGFRs (Figure 3D). These results, taken together, indicate that the requirement of EGFR signaling for the onset of neoplastic pancreatic lesions driven by K-Ras oncogenes is unique to this tumor type. Moreover, the similarity between the results obtained in clinical trials and in mouse models of lung and intestinal cancer reinforces the concept that GEM tumor models faithfully reproduce those events observed in cancer patients.

Loss of Senescence Does Not Override the Need for EGFR Signaling during PanIN and PDAC Development

The EGFR is known to promote survival signals that might be essential to overcome the oncogene-induced senescence characteristic of the early stages of pancreatic tumor development (Collado et al., 2005; Guerra et al., 2011). Indeed, most human PDACs carry a mutated or silenced *P16INK4a/P14ARF* locus, an event likely to override senescence (Hong et al., 2011). Thus, we reasoned that ablation of the p16INK4A/p19ARF tumor suppressors (from now on p16/p19), might bypass the requirement for EGFR signaling during tumor

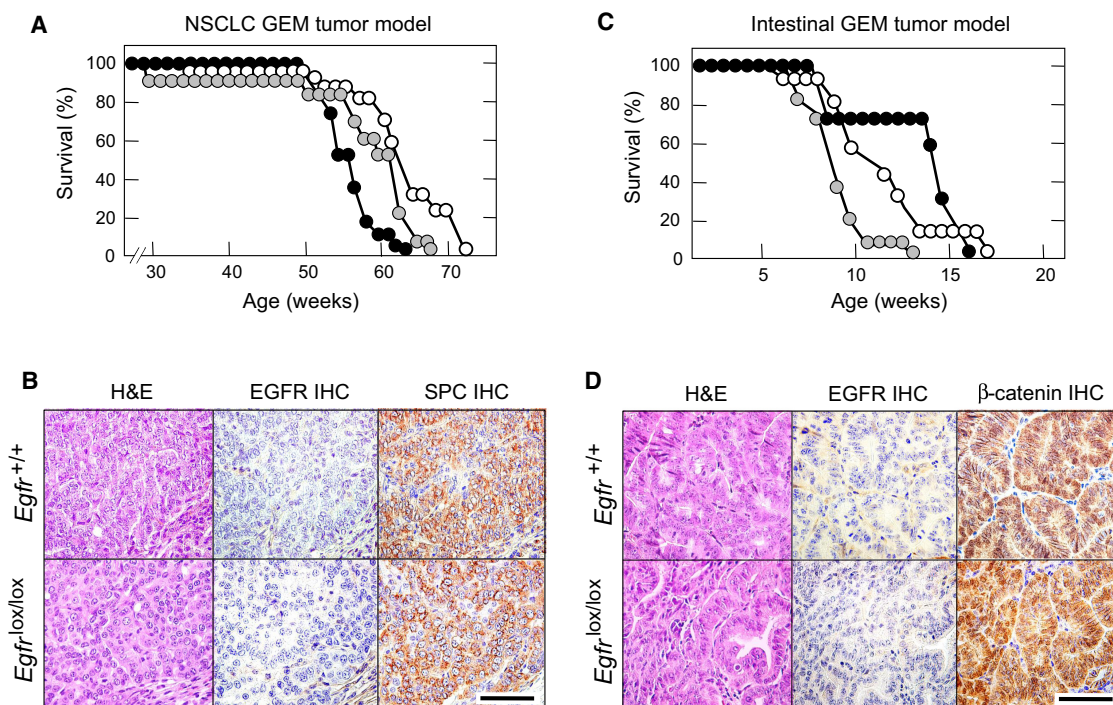


Figure 3. Ablation of EGFRs Has No Effect on K-Ras^{G12V}-Driven Lung and Intestinal Tumors

(A) Survival of $RERT;K-Ras^{G12V};Egfr^{+/+}$ (solid circles), $RERT;K-Ras^{G12V};Egfr^{+/-}$ (gray circles), and $RERT;K-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}$ (open circles) mice treated with a single injection of 4OHT at P21 to induce NSCLCs.

(B) H&E staining and EGFR and pro-surfactant protein C (SPC) immunostaining (IHC) of consecutive paraffin sections showing representative adenocarcinoma lesions from 9-month-old $RERT;K-Ras^{G12V}$ mice carrying either (top) wild-type *Egfr* or (bottom) conditional *Egfr* alleles. Scale bar represents 50 μm .

(C) Survival of $RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{+/+}$ (solid circles), $RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{+/-}$ (gray circles), and $RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}$ (open circles) mice treated with 4OHT (3 days per week, for 2 weeks) at P21 to induce intestinal tumors.

(D) H&E staining and EGFR and β -catenin immunostaining (IHC) of consecutive paraffin sections showing representative intestinal tumor lesions from 2-month-old $RERT;K-Ras^{G12V};Apc^{lox/lox}$ mice carrying either (top) wild-type *Egfr* or (bottom) conditional *Egfr* alleles. Scale bar represents 50 μm .

initiation. Conditional floxed *p16/p19* alleles were introduced into *ElasK-Ras^{G12V}* mice carrying wild-type or floxed *Egfr* alleles and their pancreata examined at 16 weeks of age, before they displayed any obvious signs of overt tumor development. These mice were not exposed to doxycycline to allow expression of the resident *K-Ras^{G12V}* oncogene during late embryonic development (Guerra et al., 2007). As summarized in Figure 4A, six out of eight mice carrying wild-type EGFRs displayed abundant low- and high-grade lesions. Moreover, five animals had developed at least a PDAC tumor at this time. In contrast, none of the mice carrying *Egfr^{lox/lox}* alleles ($n = 6$) displayed PanIN lesions or PDAC (Figure 4A).

Mice with the above genotypes were allowed to age. Littermates carrying wild-type *Egfr* alleles, either in homozygosity ($n = 12$) or heterozygosity ($n = 30$) succumbed to the disease before they reached 10 months of age (Figure 4B). Postmortem analysis revealed multiple lesions including invasive and metastatic PDAC as well as anaplastic carcinomas that metastasized to multiple organs (Aguirre et al., 2003; Guerra et al., 2011). As expected, none of the low-grade PanIN lesions contained senescent cells as determined by staining for β -galactosidase activity (data not shown). In contrast, *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* mice ($n = 7$) sacrificed at 1 year of age did not carry any PanIN lesion positive for EGFRs

in spite of careful analysis of multiple serial sections (data not shown). Only four animals had a total of six low-grade and two high-grade PanIN “escaper” lesions positive for EGFRs (Figure 4C). Seventeen additional *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* mice were allowed to age beyond 1 year. All of them remained in good health condition at 80 weeks of age (Figure 4B). Histological examination of their pancreata at this time did not reveal any lesions (data not shown). These observations indicate that abrogation of senescence by inactivation of the *p16/p19* tumor suppressors does not relieve pancreatic tumor cells of their need for EGFR signaling.

Loss of *p16/p19* tumor suppressors also accelerates tumor development in adult mice providing they have undergone chronic or temporary pancreatitis (Guerra et al., 2011). Analysis of pancreata of *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* mice ($n = 7$) 12 months after turning on *K-Ras^{G12V}* expression (8 months after completing caerulein treatment), also failed to reveal EGFR-negative PanIN lesions or PDAC tumors. Control *ElasK-Ras^{G12V};p16/p19^{lox/lox};Egfr^{+/+}* littermates ($n = 10$) died at the expected age (40 weeks of median survival) and displayed multiple PanIN lesions as well as PDACs, in some cases with perineural invasion, invasion of the intestinal wall and lymph node metastasis, as previously described (Guerra et al., 2011). These observations indicate that the requirement for EGFR

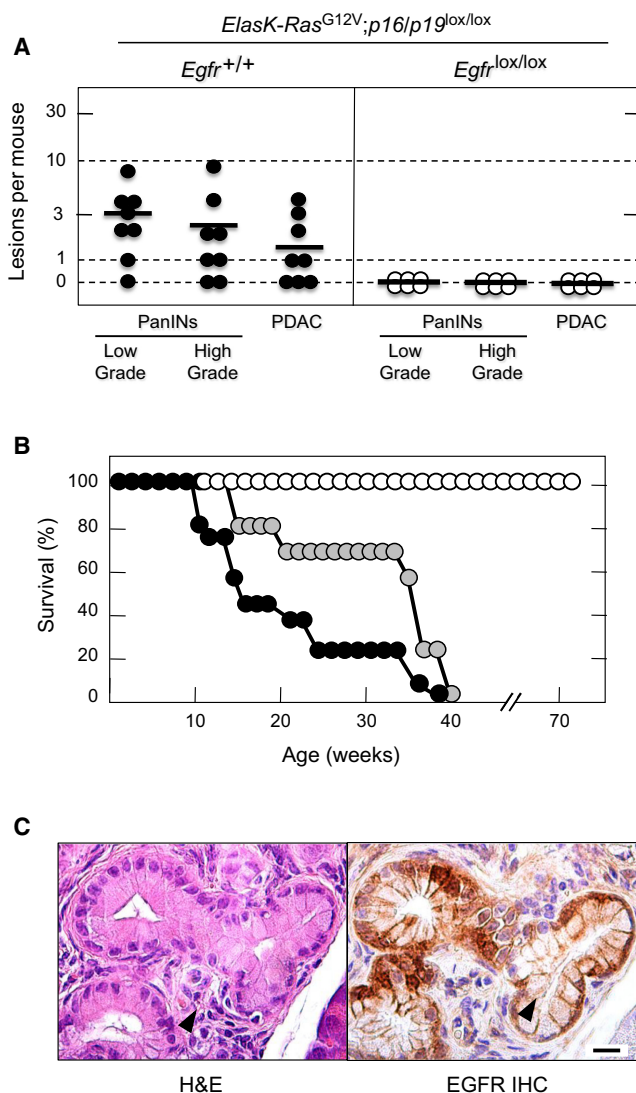


Figure 4. Loss of p16/p19 Tumor Suppressors Does Not Abrogate the Need for EGFR Expression during PanIN and PDAC Development

(A) Number of low- and high-grade PanINs and PDAC lesions per mouse in untreated, 16-week-old *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox} mice carrying either wild-type (solid circles) or conditional (open circles) *Egfr* alleles. In these mice, expression of a Cre recombinase in pancreatic acinar cells during late embryonic development results in the concomitant expression of the endogenous *K-Ras*^{G12V} oncogene and in the ablation of the conditional *p16/p19* and *Egfr* alleles. PanIN lesions positive for EGFR expression in *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} mice (see below) were not scored. Horizontal bars indicate the average number of lesions per mouse.

(B) Survival of untreated *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/+} (solid circles), *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/lox} (gray circles), and *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} (open circles) mice.

(C) H&E (left) and EGFR IHC (right) of consecutive paraffin sections showing an occasional PanIN lesion observed in *ElasK-Ras*^{G12V}; *p16/p19*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} animals positive for EGFR expression (arrowhead). Scale bar represents 50 μm.

signaling during PanIN and PDAC development cannot be compensated by loss of the p16/p19 tumor suppressors even in the context of an inflammatory response induced by pancreatitis.

Loss of p53 Triggers Oncogenic Pathways Independent of EGFR Signaling

Human PDAC tumors harbor mutations in classical tumor suppressor genes such as *TP53*, *SMAD4*, or *BRCA2* (Hong et al., 2011). Likewise, mice expressing an endogenous *K-Ras* oncogene during embryonic development in the absence of a functional p53 protein develop aggressive PanINs and PDAC tumors that result in the death of the animals within their first 4 to 5 months of life (Hingorani et al., 2005; Guerra et al., 2007). Similar results have been obtained in the context of adult *K-Ras* oncogene expression followed by pancreatic damage (Guerra et al., 2011). To examine the effect of abrogating EGFR signaling in the absence of p53, we inserted conditional *p53*^{lox} alleles in the *ElasK-Ras*^{G12V} strain in the presence of wild-type or floxed *Egfr* alleles. Animals were sacrificed at 10 weeks of age before they showed signs of overt tumor development. As summarized in Figure 5A, control mice carrying wild-type *Egfr* alleles (*n* = 7) displayed abundant low- and high-grade lesions and PDAC, averaging ten high grade PanINs and four PDAC tumors per mouse. Interestingly, mice carrying conditional *Egfr* alleles (*n* = 5) also displayed neoplastic lesions but with reduced incidence (Figure 5A).

When we allowed these mice to age, all animals carrying wild-type *Egfr* alleles (*n* = 10) succumbed to pancreatic tumors around 20 weeks of age with a median survival of 12 weeks (Figure 5B). Similar results were obtained with heterozygous mice (*n* = 13) (Figure 5B). At the time of death or humane end point, these mice displayed multiple PanIN lesions and PDAC tumors including a lung metastasis in one of the animals. *ElasK-Ras*^{G12V}; *p53*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} mice (*n* = 13) also developed low- and high-grade PanINs as well as PDAC tumors (Figure 5B). Moreover, three of these mice also had macroscopic metastasis at different locations such as peritoneum, diaphragm, liver, and lung (data not shown). However, mice in which the conditional *Egfr* alleles have been ablated died by 40 weeks of age and displayed a median survival 83% longer than that of littermates expressing EGFRs (22 versus 12 weeks) (Figure 5B). Similar results were obtained with mice that expressed the resident *K-Ras*^{G12V} oncogene during adulthood and were treated for 3 months with caerulein. Whereas *ElasK-Ras*^{G12V}; *p53*^{lox/lox}; *Egfr*^{lox/lox} animals (*n* = 26) died before reaching 60 weeks of age with a median survival of 38 weeks, control *ElasK-Ras*^{G12V}; *p53*^{lox/lox}; *Egfr*^{+/lox} mice (*n* = 8) were dead at 35 weeks of age with a median survival of 27 weeks (data not shown). Thus, ablation of EGFR signaling resulted in an increased survival time of 40%.

Tumor development in mice carrying conditional *Egfr* alleles was not due to incomplete recombination because the large majority of the PanIN lesions and PDAC tumors did not express EGFRs when analyzed by IHC (Figure S4A). Moreover, PCR analysis of DNA isolated from tumor cells also failed to reveal unrecombined *Egfr*^{lox} alleles in most lesions (data not shown). Finally, histopathological analysis of PanIN and PDAC tumors lacking p53 and EGFRs did not reveal significant differences with those present in control animals (Figure S4A). These observations, taken together, indicate that loss of p53 activates oncogenic pathways that bypass the requirement of EGFR signaling for tumor development.

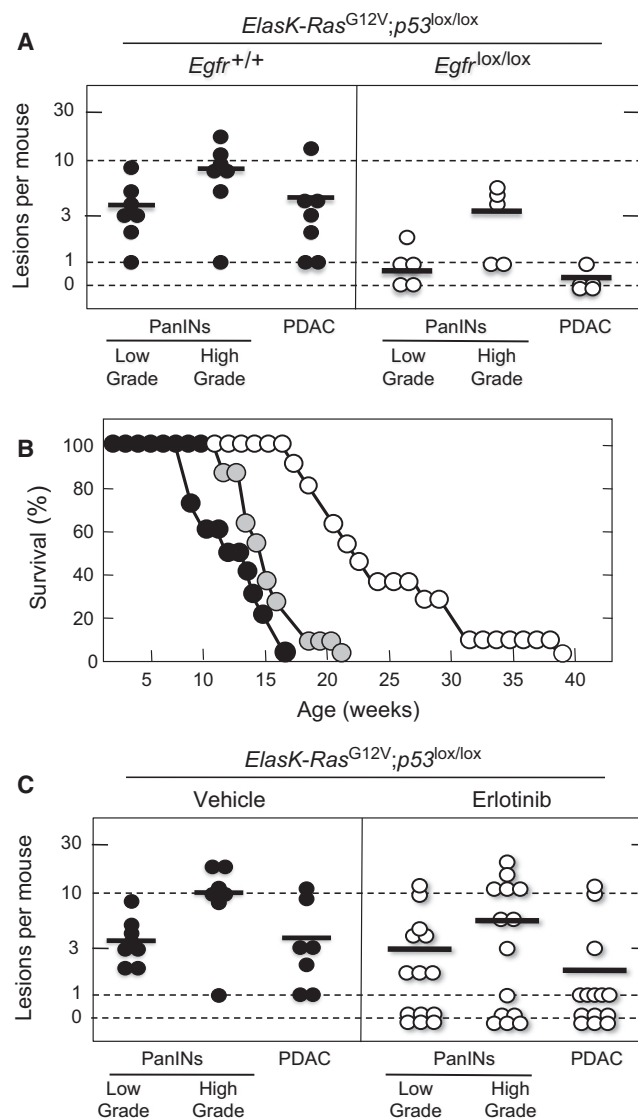


Figure 5. Loss of EGFRs Delays but Does Not Prevent PanIN and PDAC Development in the Absence of p53

(A) Number of low- and high-grade PanINs and PDACs per mouse in untreated, 10-week-old *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* mice carrying either wild-type (solid circles) or conditional (open circles) *Egfr* alleles. In these mice, expression of a Cre recombinase in pancreatic acinar cells during late embryonic development results in the concomitant expression of the endogenous *K-Ras^{G12V}* oncogene and in the ablation of the conditional *p53* and *Egfr* alleles. Horizontal bars indicate the average number of lesions per mouse.

(B) Survival of untreated *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/+}* (solid circles), *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{+/lox}* (gray circles), and *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* (open circles) mice.

(C) Inhibition of EGFR signaling by Erlotinib treatment reduces the number of PanIN and PDAC lesions. Number of low- and high-grade PanINs and PDACs per mouse in 6-week-old *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* mice treated for 4 weeks with vehicle (solid circles) or Erlotinib (open circles). Horizontal bars indicate the average number of lesions per mouse. The decrease in the number of PDAC tumors in the Erlotinib-treated cohort was statistically significant ($p < 0.05$).

See also Figure S4.

Inhibition of EGFR Signaling with Erlotinib Interferes with PDAC Development In Vivo

Previous studies have shown that Gefitinib can slow down progression of pancreatic precursor lesions to PDAC (Mohammed et al., 2010). To determine whether EGFRs are required for the progression of PanIN lesions in a more aggressive GEM model, 6-week-old *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* mice were treated with either vehicle or Erlotinib (100 mg/Kg) for 4 weeks. A small group of mice ($n = 3$) analyzed at the start of the treatment revealed low- and high-grade PanINs in each of the animals. Moreover, two of the mice already carried small PDACs (Figure S4B). At the end of the 4-week treatment, all mice that received vehicle ($n = 7$) displayed a significant increase in the number of lesions (Figure 5C). In contrast, Erlotinib treatment led to disappearance of all lesions in three out of the 14 animals included in this cohort. Moreover, three additional Erlotinib-treated mice contained PanIN lesions but no PDAC tumors (Figure 5C). Overall, the Erlotinib-treated cohort had fewer lesions than the control group, indicating a limited but reproducible therapeutic effect of this EGFR inhibitor on PDAC development (Figure 5C).

IHC analysis of lesions in mice treated with Erlotinib for 4 weeks revealed robust inhibition of pAKT but not of pSTAT3 or pERK when compared with samples obtained from control mice treated with vehicle (Figure S4C). As an additional control, we examined the status of pAKT, pSTAT3 and pERK in *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* mice carrying either wild-type or conditional *Egfr* alleles. As expected, ablation of EGFR expression resulted in inhibition of pAKT but not of pSTAT3 or pERK (Figure S4D). Interestingly, full blown PDACs retained pAKT IHC (Figure S4E), a result confirmed by western blot analysis (Figure S5 and data not shown). These observations suggest that loss of p53 might activate the PI3K pathway by a mechanism independent of EGFR signaling.

EGFR Signaling Is Required for Proliferation of PDAC Tumor Cell Explants

Knockdown of EGFR expression effectively slowed proliferation of cell explants derived from PDAC tumors isolated from *ElasK-Ras^{G12V}* mice (Figure 6A). Similar results were obtained using explants from tumors obtained from *ElasK-Ras^{G12V};p16^{+/lox};p19^{lox/lox}* and *ElasK-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* animals (Figure 6A). These tumor explants, regardless of genotype, were also sensitive to Erlotinib (Figure 6B). As expected, Erlotinib had a cytostatic effect because inhibition required continuous exposure to the drug (data not shown). Knockdown of EGFRs in these tumor explants significantly inhibited phosphorylation of STAT3 (Figure S5). Phosphorylation of ERK proteins was also ameliorated by EGFR knockdown (Figure S5), possibly an indirect consequence of the limited proliferation of these cells in the absence of EGFRs (Figure 6A). Interestingly, phosphorylation of AKT, a marker for the activation of the PI3K/AKT survival pathway was downregulated in all explants except in those lacking p53 (Figure S5).

Cooperation between PI3K and STAT3 Signaling Pathways in the Absence of EGFRs

We reasoned that availability of mouse PDAC tumor explants lacking EGFRs and p53 may allow us to identify additional signaling pathways that contribute to tumor development.

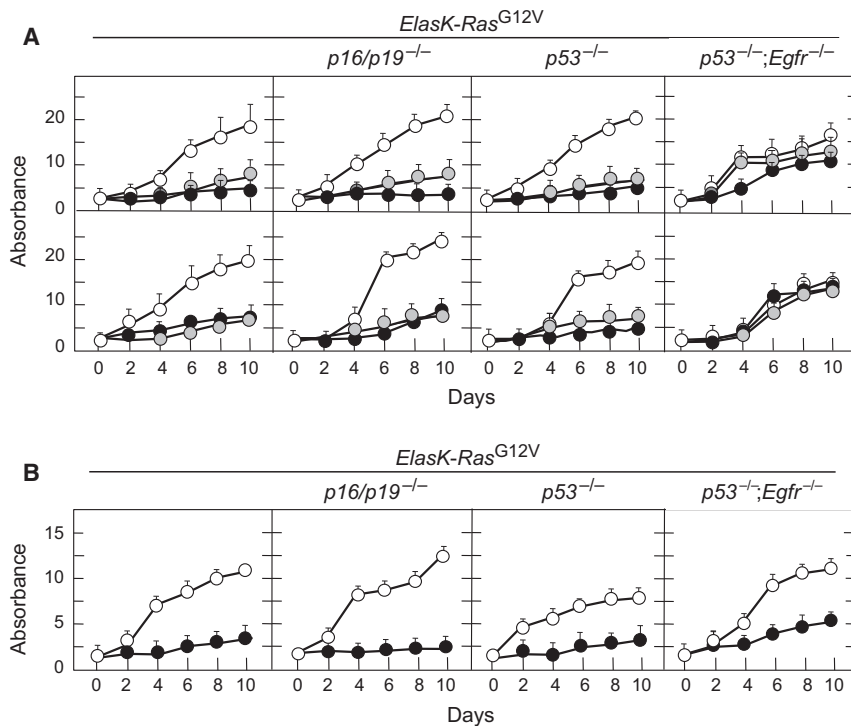


Figure 6. EGFR Expression Is Required for Proliferation of PDAC Tumor Explants In Vitro

(A) PDAC cell explants derived from tumors present in mice with the indicated genotypes were infected with lentiviral vectors expressing two independent shRNAs against the *Egfr* (solid and gray circles) or shRNA control (open circles). Results are the average of two experiments carried out with two independent cell explants done in triplicate. Errors bars mean SD.

(B) PDAC cell explants derived from tumors present in mice with the indicated genotypes were either untreated (open circles) or treated with Erlotinib (solid circles). Erlotinib was used at a final concentration of 50 μ M, a concentration that corresponds with the average IC_{50} for these cell explants. Results are the average of two experiments carried out with two independent cell explants done in triplicate. Errors bars mean SD. See also Figure S5.

Unexpectedly, Erlotinib partially inhibited proliferation of PDAC explants from *Elask-Ras^{G12V};p53^{lox/lox};Egfr^{lox/lox}* mice. These results are most likely due to off-target effects because shRNAs against the *Egfr* locus did not have any inhibitory effect on the proliferation rate of these cells (Figures 6A and 6B). As illustrated in Figure 7, inhibition of PI3K with ETP-46992 (Martínez González et al., 2012) a selective inhibitor for the p110 α and δ catalytic subunits only induced partial inhibition (Figure S6). However, combination of this inhibitor with Erlotinib resulted in robust inhibition of these tumor cell explants even in the absence of EGFRs and p53 (Figure 7).

As indicated above, ablation or inhibition of EGFRs in *Elask-Ras^{G12V};p53^{lox/lox}* mice blocked AKT but not STAT3 phosphorylation (Figures S4C and S4D). Interestingly, knockdown of STAT3 expression did not inhibit proliferation of tumor cell explants, regardless of their genotype. However, addition of the PI3K inhibitor to the *Stat3* shRNA robustly inhibited proliferation of all tumor cell explants (Figure 7). These observations indicate that the STAT3 pathway also contributes to tumor development at least in the absence of p53. Moreover, in this context, PI3K may signal by pathways independent of AKT (Vogt and Hart, 2011). Thus, successful treatment of PDAC tumors in the clinic may require compound inhibition of at least four distinct signaling cascades including those driven by K-RAS, EGFR, PI3K, and STAT3.

DISCUSSION

Current dogma indicates that malignant progression of tumor cells selects against mutations in components of the same signaling pathway such as that driven by the EGFR and their downstream effectors, the RAS proteins. Indeed, clinical obser-

ations in NSCLCs, a tumor type that present frequent mutations in both EGFR and K-RAS, have indicated that they are mutually exclusive (Shigematsu et al., 2005). Similar results have been obtained in CRC patients. According to a large clinical trial, only patients containing nonmutated K-RAS genes benefit from treatment with EGFR inhibitors (Karapetis et al., 2008). This dogma, however, might not apply to PDAC tumors. Although EGFR mutations have been found in a very small percentage (<3%) of human pancreatic cancers, they can coexist with K-RAS mutations (Oliveira-Cunha et al., 2012). Moreover, as illustrated in this study, initiation of K-Ras oncogene-driven PanIN lesions and PDAC is absolutely dependent on EGFR signaling. This requirement is not abrogated even in the absence of the p16/p19 tumor suppressors, indicating that the absolute requirement for EGFR signaling is not involved in overcoming senescence. Only ablation of p53 overrules this requirement. Yet, neoplastic lesions lacking p53 take significantly longer to develop in the absence of EGFRs. Ongoing efforts to establish the mutational spectra of mouse PDAC exomic sequences might help us to identify those additional pathways activated by loss of p53.

Pancreatic injury results in the immediate induction of EGFR expression in acinar cells, leading to activation of the PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways. EGFR expression, along with activation of AKT and STAT3, is maintained during PanIN progression to PDAC and only becomes attenuated in poorly differentiated glands of advanced PDAC tumors. The EGFR is also expressed in human biopsies obtained from patients suffering from pancreatitis and PDAC tumors, thus supporting the concept that GEM models faithfully reproduce PDAC development in an experimental setting. Previous studies have shown that overexpression of TGF α in the presence of a resident K-Ras^{G12D} oncogene accelerated progression of PanIN lesions to metastatic cancer and led to the development of cystic papillary lesions that resembled human intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) (Siveke et al., 2007). These observations,

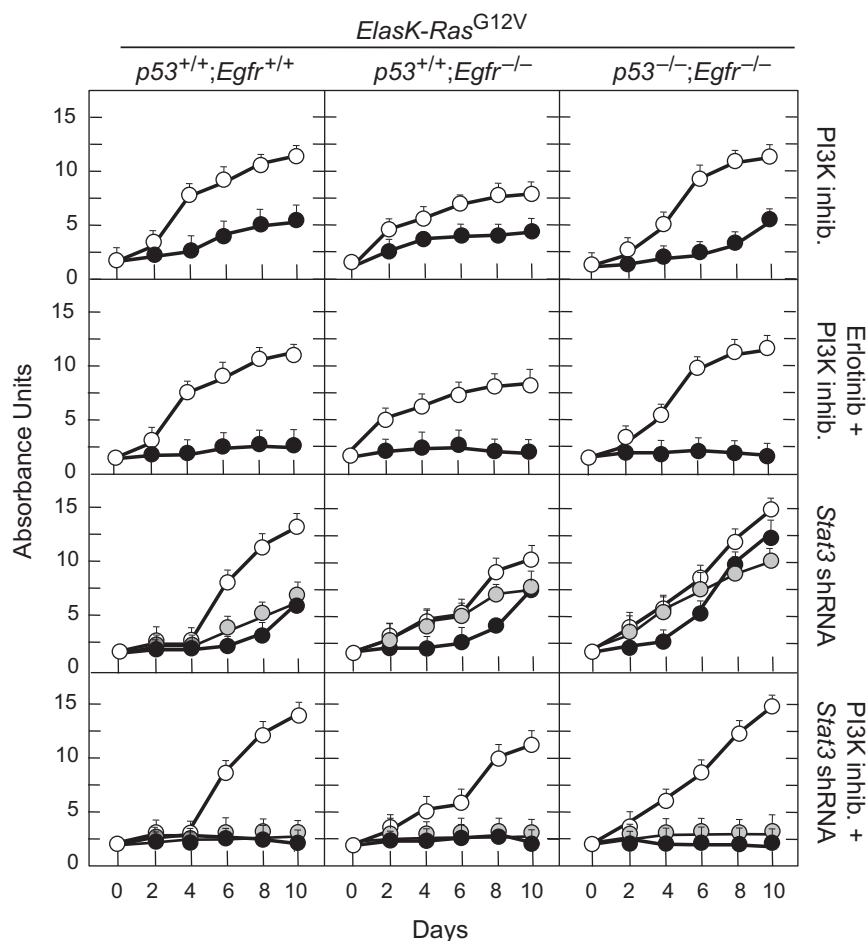


Figure 7. Loss of p53 Activates STAT3 and PI3K Pathways

PDAC cell explants derived from tumors present in mice with the indicated genotypes were treated with the indicated inhibitor(s) or infected with lentiviral vectors expressing two independent shRNA against *Stat3* (solid and gray circles). Control cells were either left untreated or infected with a shRNA control (open circles). Erlotinib was used at a final concentration of 50 μ M, a concentration that corresponds with the average IC_{50} for these cell explants. ETP-46992, a selective PI3Kp110 α and p110 δ inhibitor, was used at a final concentration of 20 μ M, a concentration that corresponds to the average IC_{50} for these tumor explants. Each graph represents the average of two experiments carried out with two independent cell explants. Each sample was carried out in triplicate. Errors bars mean SD. See also Figure S6.

Finally, our results using genetic as well as pharmacologic approaches, illustrate that blocking EGFR signaling only produces limited therapeutic benefit in the context of p53 inactivation, a mutation present in most human PDAC tumors. Availability of tumor cells lacking EGFRs and p53 has allowed us to demonstrate a synergistic activity between PI3K inhibitors and attenuation of STAT3 expression. These observations suggest that loss of TP53 might “reactivate” the PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways by mechanisms independent of EGFR in

taken together, suggest that upregulated expression of EGFRs leading to the activation of the PI3K/AKT and STAT3 pathways might be one of the early responses that predispose acinar cells to undergo neoplastic changes upon activation of K-Ras oncogenes. It is interesting to note that in acinar cells, activation of the PI3K/AKT pathway is mediated by induction of EGFRs and not by the resident K-Ras oncogenes. These observations may explain why, in spite of the presence of K-Ras oncogenes, EGFR signaling is essential to induce neoplastic lesions in pancreatic acinar cells.

Current GEM models of PDAC do not allow target ablation in existing tumors. Yet, our results demonstrating that expression of EGFRs are essential for the proliferation of tumor cell explants strongly suggest that EGFRs signaling is essential beyond the early stages of tumor development. Indeed, knock-down or pharmacological inhibition of EGFRs blocked proliferation of certain human pancreatic tumor cells lines. Likewise, EGFR inhibitors have been shown to limit progression of pancreatic lesions in mouse xenograft models (Ng et al., 2002; Durkin et al., 2006) as well as in K-Ras oncogene-driven GEM models (Mohammed et al., 2010; this study). These results suggest that clinical observations showing a limited beneficial effect of EGFR inhibitors in combination with Gemcitabine in patients with PDAC tumors need to be further explored (Moore et al., 2007).

human tumors. Further support for a key role of the EGFR/PI3K/AKT axis in PDAC development comes from preliminary studies in which ablation of the *Pten* tumor suppressor locus in *ElasK-Ras^{G12V};Egfr^{lox/lox}* mice leads to efficient tumor development (C.N., I.H., C.G., and M.B., unpublished observations). Recent observations regarding a limited but significant tumor inhibitory effect by inhibitors of the Notch pathway (Plentz et al., 2009; Cook et al., 2012) may open the door to design therapeutic strategies in combination with PI3K and STAT3 inhibitors. Yet, to induce complete regression of aggressive PDAC tumors it will be necessary to unveil additional signaling pathways amenable to pharmacological inhibition. Recent progress in overcoming the stromal barrier characteristic of PDAC tumors (Olive et al., 2009; Von Hoff et al., 2011; Frese et al., 2012; Jacobetz et al., 2012; Provenzano et al., 2012) should facilitate testing these drug combinations in relevant GEM models of pancreatic cancer as a preliminary step prior to their use in a clinical setting.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

The *ElasK-Ras^{G12V}* strain has been previously described (Guerra et al., 2007). In these mice, the *Elas-tTA/tetO-Cre* transgenes drive expression of the bacterial Cre recombinase from the *Elastase* promoter under the negative control of doxycycline (Tet-off system). Other strains of mice used in this study include *Egfr^{lox}*, *p16/p19^{lox}*, *p53^{lox}*, *Apc^{lox}*, and *RERT*. The original references

describing these strains appear in the [Supplemental Experimental Procedures](#). All experiments were approved by the CNIO Ethical Committee and performed in accordance with the guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals as stated in The International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals, developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS).

Mouse Treatments

To prevent expression of the *Elastase*-driven Cre recombinase in *ElasK-Ras*^{G12V} mice, doxycycline (2 mg/ml; Sigma) was provided in the drinking water as a sucrose solution (5% w/v) to pregnant mothers from the time of conception and to their offspring until the time we activated expression of the resident *K-Ras*^{G12V} oncogene. Pancreatitis was induced by intraperitoneal injections of caerulein for 3 months (125 µg/Kg, 5 days per week; Sigma). For induction of NSCLC, *RERT;K-Ras*^{G12V} mice carrying wild-type or floxed *Egfr* alleles were treated at P21 with a single dose of 4OHT (0.5 mg/ml in oil). For intestinal tumors, *RERT;K-Ras*^{G12V}; *Apc*^{lox/lox} mice carrying wild-type or floxed *Egfr* alleles were treated 3 days per week for 2 weeks with 4OHT (0.5 mg/ml in oil) starting at P21. Erlotinib treatment was carried out in 6-week-old *ElasK-Ras*^{G12V}; *p53*^{lox/lox} mice by oral gavage (100 mg/Kg in 0.5% methylcellulose with 0.1% Tween80) for 4 weeks. Control mice received the same treatment without Erlotinib.

Histopathology and Immunohistochemistry

Specimens were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. For histopathological analysis, pancreata were serially sectioned (3 µm thick) and every ten sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). Remaining sections were kept for immunohistochemical studies with β-catenin (1:750, goat polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, Sc-1496), pAKT (pS473) (1:175, rabbit monoclonal EP2109Y; Epitomics 2118-1), EGFR (1:100, rabbit monoclonal; Epitomics 1902-1), SPC (1:175, rabbit polyclonal; Millipore, AB3786), and pSTAT3 (Tyr705) (1:100, rabbit monoclonal D3A7; Cell Signaling Technology, 9145) antibodies. Following incubation with the primary antibodies, positive cells were visualized using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride plus (DAB+) as a chromogen. For human samples (see below), immunostaining for EGFRs was performed as described above.

PDAC Cell Explants

To generate mouse PDAC explants, freshly isolated tumors were minced with sterile razor blades, digested with collagenase P (1.5 µg/ml) in Hanks' balanced salt solution (HBSS) for 30 min at 37°C, and cultured in DMEM with 10% of fetal bovine serum (FBS). After 48 hr, media was supplemented with Geneticin (75 µg/ml) to select for *K-Ras*^{G12V} expressing cells. All studies were done on cells cultivated for less than ten passages. Their corresponding genotypes were verified by PCR analysis.

Cell Culture and Inhibitor Treatments

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were isolated from E13.5 embryos and propagated according to standard 3T3 protocols. Human tumor cell lines PANC1, MIAPaCa-2, SKPC, T3M4, were purchased from ATCC. BxPc3 was kindly provided by M. Hidalgo (CNIO). AsPc1, CFPAC, and IMIMPC-2 by F.X. Real (CNIO). These cell lines as well as the PDAC explants were seeded in 96-well plates at a density of 1,000 cells/well or 300 cells/well, respectively, and incubated for 24 hr in DMEM media supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (GIBCO-Invitrogen) before adding the corresponding inhibitor. Inhibitors, including EGFR inhibitor Erlotinib (LC laboratories), MEK inhibitor PD0325901 (Pfizer), and PI3K inhibitor ETP-46992 (CNIO) (Martínez González et al., 2012), were dissolved in DMSO to yield the appropriate final concentrations. Three sets of control wells were included on each plate, containing either medium without drug or medium with the same concentration of DMSO. Cells were exposed to inhibitors for 10 to 14 days. Fresh drug was added every 2 days. For shRNA knock-down assays, human or mouse tumor cells were infected with MISSION shRNAs (Sigma) directed against human *EGFR* (TRC0000121206 and TRC0000121203), mouse *Egfr* (TRCN0000055218 and TRCN0000055221), and mouse *Stat3* (TRCN0000071454 and TRCN0000071456) sequences. Non-Target shRNA Control vector (SHC002, Sigma) was used as a negative control. Cells were selected with puromycin (2 µg/ml) for 5 days before seeding

and maintained in DMEM media supplemented with 10% FBS and puromycin. Proliferation rates were determined by the (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Roche). The resulting absorbance was measured with a microplate reader at 544 nm (EnVision 2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer, Waltham, MA). Results represent the average of three independent experiments in which all samples were assayed in triplicate.

Human Samples

Studies using human material were approved by the Ethics and Institutional Review Board of the Grupo Hospital de Madrid (CBBA/4 2008; REF: PI 275). All subjects gave informed consent.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.001>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Howard C. Crawford (Mayo Clinic, Jacksonville, FL) and Jens T. Siveke (Technical University, Munich) for sharing their results prior to publication. We also thank I. Agudo, I. Aragón, M.C. González, M. Lamparero, M. San Román, and R. Villar for excellent technical assistance. We value the excellent support provided by V. Alvarez, E. Gil, M. Gómez, P. González, and N. Mate-sanz with histopathology and M. Lozano with the laser-capture microscope. We thank J. Pastor and S. Martínez (CNIO) for providing a sample of the PI3K inhibitor, ETP-46992, E. Garcia, M. Hidalgo, and F.X. Real (CNIO) for human samples, and A. Means (Vanderbilt University Medical Centre, Nashville, TN) for help with acinar to ductal transdifferentiation protocols. Work was supported by grants from the European Research Council (ERC-AG/250297-RAS AHEAD), the EU-Framework Programme (LSHG-CT-2007-037665, HEALTH-F2-2010-259770, HEALTH-2010-260791), the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2006-11773, CSD2007-00017), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2011-30173), Autonomous Community of Madrid (GR/SAL/0587/2004, S2006/BIO-0232), and the Fundación de la Mutua Madrileña del Automóvil to M.B. and grants from Fondo de Investigación Sanitaria (PI042124, PI08-1623), Autonomous Community of Madrid (GR/SAL/0349/2004), and Fundación Ramón Areces (FRA 01-09-001) to C.G. M.S. acknowledges funding by the Doctoral Program "Inflammation and Immunity" DK W1212, the EC program LSHC-CT-2006-037731 (Growth-stop), and the Austrian Federal Government's GEN-AU program "Austro-mouse" (GZ 200.147/1-VI/1a/2006 and 820966).

Received: February 22, 2012

Revised: May 8, 2012

Accepted: August 1, 2012

Published: September 10, 2012

REFERENCES

- Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., and DePinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 17, 3112–3126.
- Burris, H.A., 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., et al. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 15, 2403–2413.
- Campbell, P.J., Yachida, S., Mudie, L.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., Stebbings, L.A., Morsberger, L.A., Latimer, C., McLaren, S., Lin, M.L., et al. (2010). The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 467, 1109–1113.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.

- Cook, N., Frese, K.K., Bapiro, T.E., Jacobetz, M.A., Gopinathan, A., Miller, J.L., Rao, S.S., Demuth, T., Howat, W.J., Jodrell, D.I., and Tuveson, D.A. (2012). Gamma secretase inhibition promotes hypoxic necrosis in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Exp. Med.* 209, 437–444.
- Corcoran, R.B., Contino, G., Deshpande, V., Tzatsos, A., Conrad, C., Benes, C.H., Levy, D.E., Settleman, J., Engelman, J.A., and Bardeesy, N. (2011). STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Res.* 71, 5020–5029.
- Durkin, A.J., Osborne, D.A., Yeatman, T.J., Rosemurgy, A.S., Armstrong, C., and Zervos, E.E. (2006). EGF receptor antagonism improves survival in a murine model of pancreatic adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 135, 195–201.
- Frese, K.K., Neesse, A., Cook, N., Bapiro, T.E., Lolkema, M.P., Jodrell, D.I., Tuveson, D.A., and Tuveson, D.A. (2012). nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov.* 2, 260–269.
- Fukuda, A., Wang, S.C., Morris, J.P., 4th, Folias, A.E., Liou, A., Kim, G.E., Akira, S., Boucher, K.M., Firpo, M.A., Mulvihill, S.J., and Hebrok, M. (2011). Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer Cell* 19, 441–455.
- Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4, 111–120.
- Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippo, P.J., Verdager, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., and Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11, 291–302.
- Guerra, C., Collado, M., Navas, C., Schuhmacher, A.J., Hernández-Porras, I., Cañamero, M., Rodríguez-Justo, M., Serrano, M., and Barbacid, M. (2011). Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 19, 728–739.
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 362, 1605–1617.
- Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., and Tuveson, D.A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469–483.
- Hong, S.-M., Park, J.Y., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2011). Molecular signatures of pancreatic cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 716–727.
- Jacobetz, M.A., Chan, D.S., Neesse, A., Bapiro, T.E., Cook, N., Frese, K.K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M.E., Zecchini, H.I., et al. (2012). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302529>, August 7, 2012.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801–1806.
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142, 730–733, e9.
- Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S., et al. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 1757–1765.
- Korc, M., Friess, H., Yamanaka, Y., Kobrin, M.S., Buchler, M., and Beger, H.G. (1994). Chronic pancreatitis is associated with increased concentrations of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and phospholipase C gamma. *Gut* 35, 1468–1473.
- Lesina, M., Kurkowski, M.U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., Klöppel, G., Yoshimura, A., Reindl, W., Sipos, B., Akira, S., et al. (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* 19, 456–469.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., and Abbruzzese, J.L. (2004). Pancreatic cancer. *Lancet* 363, 1049–1057.
- Maitra, A., and Hruban, R.H. (2008). Pancreatic cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 157–188.
- Martínez González, S., Hernández, A.I., Varela, C., Lorenzo, M., Ramos-Lima, F., Cendón, E., Cebrián, D., Aguirre, E., Gomez-Casero, E., Albarrán, M.I., et al. (2012). Rapid identification of ETP-46992, orally bioavailable PI3K inhibitor, selective versus mTOR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 5208–5214.
- Means, A.L., Meszoely, I.M., Suzuki, K., Miyamoto, Y., Rustgi, A.K., Coffey, R.J., Jr., Wright, C.V., Stoffers, D.A., and Leach, S.D. (2005). Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* 132, 3767–3776.
- Mohammed, A., Janakiram, N.B., Li, Q., Madka, V., Ely, M., Lightfoot, S., Crawford, H., Steele, V.E., and Rao, C.V. (2010). The epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib prevents the progression of pancreatic lesions to carcinoma in a conditional LSL-KrasG12D/+ transgenic mouse model. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 3, 1417–1426.
- Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., et al; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* 25, 1960–1966.
- Ng, S.S., Tsao, M.S., Nicklee, T., and Hedley, D.W. (2002). Effects of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774, Tarceva, on downstream signaling pathways and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 1, 777–783.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457–1461.
- Oliveira-Cunha, M., Hadfield, K.D., Siriwardena, A.K., and Newman, W. (2012). EGFR and KRAS mutational analysis and their correlation to survival in pancreatic and periampullary cancer. *Pancreas* 41, 428–434.
- Parsa, I., Longnecker, D.S., Scarpelli, D.G., Pour, P., Reddy, J.K., and Lefkowitz, M. (1985). Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma. *Cancer Res.* 45, 1285–1290.
- Plentz, R., Park, J.S., Rhim, A.D., Abravanel, D., Hezel, A.F., Sharma, S.V., Gurumurthy, S., Deshpande, V., Kenific, C., Settleman, J., et al. (2009). Inhibition of gamma-secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 136, 1741–1749.
- Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., and Hingorani, S.R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 418–429.
- Puyol, M., Martín, A., Dubus, P., Mulero, F., Pizcueta, P., Khan, G., Guerra, C., Santamaría, D., and Barbacid, M. (2010). A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 18, 63–73.
- Shigematsu, H., Lin, L., Takahashi, T., Nomura, M., Suzuki, M., Wistuba, I.I., Fong, K.M., Lee, H., Toyooka, S., Shimizu, N., et al. (2005). Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 339–346.
- Siveke, J.T., Einwächter, H., Sipos, B., Lubeseder-Martellato, C., Klöppel, G., and Schmid, R.M. (2007). Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and TGFA results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell* 12, 266–279.
- Ueda, S., Ogata, S., Tsuda, H., Kawarabayashi, N., Kimura, M., Sugiura, Y., Tamai, S., Matsubara, O., Hatsuse, K., and Mochizuki, H. (2004). The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor

and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 29, e1–e8.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet* 378, 607–620.

Vogt, P.K., and Hart, J.R. (2011). PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov.* 1, 481–486.

Von Hoff, D.D., Ramanathan, R.K., Borad, M.J., Laheru, D.A., Smith, L.S., Wood, T.E., Korn, R.L., Desai, N., Trieu, V., Iglesias, J.L., et al. (2011). Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J. Clin. Oncol.* 29, 4548–4554.

Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.

INK4a/ARF limits the expansion of cells suffering from replication stress

Angela Monasor,¹ Matilde Murga,¹ Andres J. Lopez-Contreras,¹ Carolina Navas,² Gonzalo Gomez,³ David G. Pisano³ and Oscar Fernandez-Capetillo^{1,*}

¹Genomic Instability Group; Spanish National Cancer Research Centre (CNIO); Madrid, Spain; ²Experimental Oncology Group; Spanish National Cancer Research Centre (CNIO); Madrid, Spain; ³Bioinformatics Unit; Spanish National Cancer Research Centre (CNIO); Madrid, Spain

Keywords: H2AX, ATR, replicative stress, INK4a/ARF, DNA damage

Replication stress (RS) is a source of DNA damage that has been linked to cancer and aging, which is suppressed by the ATR kinase. In mice, reduced ATR levels in a model of the ATR-Seckel syndrome lead to RS and accelerated aging. Similarly, ATR-Seckel embryonic fibroblasts (MEF) accumulate RS and undergo cellular senescence. We previously showed that senescence of ATR-Seckel MEF cannot be rescued by p53-deletion. Here, we show that the genetic ablation of the INK4a/Arf locus fully rescues senescence on ATR mutant MEF, but also that induced by other conditions that generate RS such as low doses of hydroxyurea or ATR inhibitors. In addition, we show that a persistent exposure to RS leads to increased levels of INK4a/Arf products, revealing that INK4a/ARF behaves as a bona fide RS checkpoint. Our data reveal an unknown role for INK4a/ARF in limiting the expansion of cells suffering from persistent replication stress, linking this well-known tumor suppressor to the maintenance of genomic integrity.

Introduction

DNA damage leads to mutations and cellular responses that ultimately compromise mammalian health. To minimize its effects, the DNA damage response (DDR) is a kinase-initiated signaling cascade that detects, signals and promotes the repair of chromosomal breaks.^{1,2} One of the cellular outcomes to DNA damage is senescence, which is defined as a permanent state of cell cycle arrest and which has been linked to cancer and aging. In vitro, all the conditions that induce senescence are known triggers of the DDR, such as telomere attrition,³ oncogene activation^{4,5} or reagents that induce DNA double-strand breaks (DSB).⁶ In all these cases, deletion of the tumor suppressor p53 rescues senescence, allowing cells to grow in the presence of damage. In addition to p53, the products of the INK4a/ARF locus (p16^{INK4a} and p19^{ARF}, in mice) are also important mediators of cellular senescence.^{7,8} The relevance of these gene products is evidenced by the frequent loss of the INK4a/ARF locus in human cancer. However, and in contrast to p53, several studies have failed to show a role for INK4a/ARF in the acute response to DNA breaks, such as those induced by ionizing radiation,^{9–11} which has frequently lead to unlinking this tumor suppressor from the response to DNA damage.

Among the different sources of endogenous DNA damage that cells can suffer, replication stress (RS) has gained significant attention in the recent years. This is in part due to the finding that oncogene-induced DNA damage starts with the generation of RS, which has important implications to explain how genomic aberrations evolve during tumor development.¹² Specifically, RS derives

from the accumulation of single-stranded DNA, which challenges genome integrity due to its propensity to recombine and to initiate genomic rearrangements. In mammalian cells, an RS response (RSR) initiated by ATR and Chk1 kinases limits the accumulation of ssDNA during DNA replication and delays cell cycle progression,^{13,14} likely to prevent the entry into mitosis with unreplicated loci, which would then derive into DNA breaks.¹⁵ Similarly to the DDR, a persistent activation of the ATR-dependent RSR is sufficient to initiate p53-dependent senescence.¹⁶

Not only ATR activation, but also reduced levels of ATR, promote cellular senescence. This was first seen in MEF from a mouse model of the ATR-Seckel Syndrome, which accumulate RS and enter into premature senescence.¹⁷ Interestingly, spontaneous immortalization of ATR-Seckel MEF does not occur, and subsequent efforts to transform these MEF with various oncogenes also failed,¹⁸ raising doubts as to whether cellular immortalization was at all possible in the context of low ATR activity. Moreover, and in contrast to the key role of p53 in the senescence induced by DNA breaks, senescence of ATR mutant MEF was not rescued by p53 deletion.¹⁷ On the contrary, p53 deficiency aggravated the symptoms of ATR hypomorphic and deficient mice.^{17,19} These and other observations led to the proposal that ATR inhibitors could be of particular use for the treatment of tumors with high levels of RS, particularly for those lacking p53.^{18,20–22} We here show that, in contrast to p53, deletion of the INK4a/ARF locus rescues senescence of ATR-Seckel MEF, as well as that induced by other conditions that generate RS such as nucleotide deprivation. In the context of INK4a/ARF deletion,

*Correspondence to: Oscar Fernandez-Capetillo; Email: ofernandez@cnio.es
Submitted: 05/08/13; Accepted: 05/13/13
<http://dx.doi.org/10.4161/cc.25017>

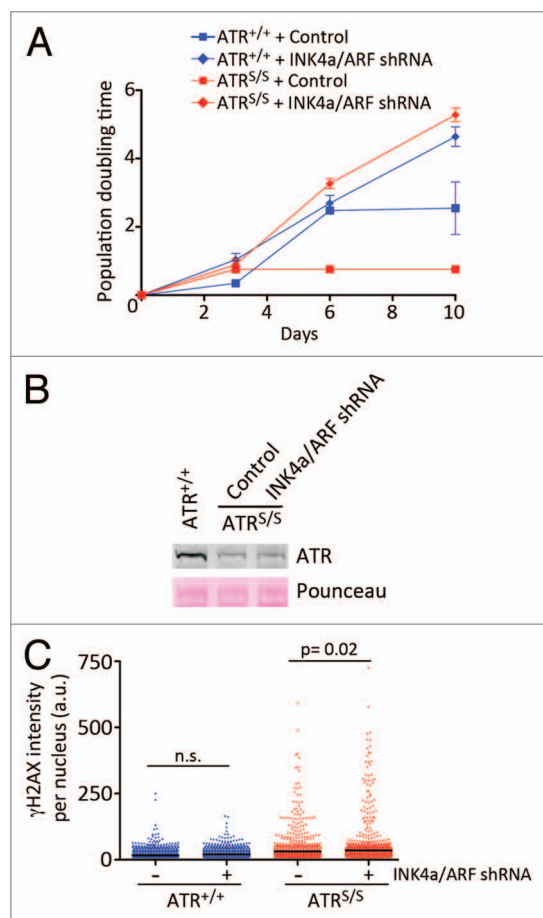


Figure 1. INK4a/ARF limits the growth of ATR-Seckel MEF. **(A)** Growth curves of ATR^{+/+} and ATR^{S/S} MEF that had been infected with a control retrovirus or with a retrovirus expressing an shRNA against both products of the INK4a/ARF locus. Data represent mean and s.d. (n = 3). **(B)** Western blot analysis of ATR levels in wt MEF, as well as in ATR-Seckel MEF that had been infected with a control retrovirus, or with a retrovirus expressing a shRNA against both products of the INK4a/ARF locus. **(C)** High-throughput microscopy (HTM)-mediated quantification of the levels of γH2AX per nucleus found on ATR^{+/+} and ATR^{S/S} MEF that had been infected with a control retrovirus or with a retrovirus expressing a shRNA against both products of the INK4a/ARF locus. The levels on the INK4a/ARF-depleted cells were measured 10 d after infection, to illustrate the levels of RS on growing cultures of ATR mutant cells. Data are representative of three independent analyses; n.s., non-significant.

cells can sustain growth in the presence of abundant levels of RS. Consistent with these findings in MEF, we also find low levels of p16^{INK4a} expression in human cancer cell lines containing high levels of copy number variants (CNV), which are the outcome to a persistent exposure to RS.²³ Collectively, these data reveal an important role of INK4a/ARF in limiting the growth of RS-harboring cells, and help to illustrate an active role for INK4a/ARF in genome maintenance.

Results

Depletion of INK4a/ARF rescues senescence on ATR-Seckel MEF. Early studies in MEF showed that the bypass of

spontaneous or oncogene-induced senescence invariably occurs through the mutually exclusive loss of p53 or INK4a/ARF.^{24,25} Given that loss of p53 not only does not rescue but rather aggravates the phenotypes of ATR-Seckel MEF,¹⁷ we explored the impact of losing INK4a/ARF. First, we infected ATR mutant MEF with retroviruses expressing short hairpin RNAs targeting both products of the INK4a/ARF locus, and which have been previously validated in several studies.^{26,27} In contrast to MEF that had been infected with a control retrovirus, INK4a/ARF depletion rescued proliferation on ATR-Seckel (ATR^{S/S}) cells (Fig. 1A). We then tested whether INK4a/ARF depletion had an impact on ATR levels. However, growing cultures of ATR^{S/S} MEF depleted for INK4a/ARF presented the same reduction of ATR as the one seen in ATR mutant cells (Fig. 1B). These data suggested that ATR-Seckel MEF depleted for INK4a/ARF could be growing in the presence of RS. In mammalian cells, RS leads to a pan-nuclear phosphorylation of the histone H2A variant H2AX, which we have shown in the past can be rigorously quantified through high-throughput microscopy (HTM).^{18,20} As shown in Figure 1C, growing cultures of INK4a/ARF-depleted ATR^{S/S} MEF presented similar levels of RS as INK4a/ARF-proficient Seckel MEF. In summary, depletion of INK4a/ARF allows the growth of ATR-Seckel MEF in the presence of substantial amounts of RS.

INK4a/ARF regulate senescence in response to RS. To explore the impact of RS on p16^{INK4a} and p19^{ARF} expression, wild type (wt) MEF were exposed to an inhibitor of the ribonucleotide reductase (hydroxyurea, HU), which leads to nucleotide depletion and RS, as well to an ATR inhibitor (ATRi) recently developed in our group.²⁰ Given their low size and expression, which frequently complicates their biochemical detection, and in order to facilitate a rigorous quantification of p16^{INK4a} and p19^{ARF} levels, we implemented a HTM assay that could measure the expression of both proteins in each individual cell. The specificity of this assay was validated with the inclusion of INK4a/ARF-deficient MEF as a negative control for p16^{INK4a} and p19^{ARF} signals. As shown in Figure 2A, a persistent exposure to low doses of HU or ATRi led to the accumulation of cells with increased levels of p16^{INK4a} and p19^{ARF}, showing that a persistent exposure to RS promotes the expression of this locus. Similarly, the levels of INK4a/ARF gene products were also constitutively higher in cultures of ATR^{S/S} MEF, which, as mentioned, present high levels of RS (Fig. 2B). Moreover, p16^{INK4a} and γH2AX levels correlated on a cell-by-cell basis on ATR mutant cells, further supporting that RS can induce the expression of the INK4a/ARF locus (Fig. 2C). Finally, and consistent with HTM data, protein and mRNA levels of p16^{INK4a} and p19^{ARF} were also induced by RS (Fig. 2D and E). In summary, these data support that a persistent exposure to RS leads to the activation of INK4a/ARF-dependent senescence.

A limited role for INK4a/ARF on ATR-Seckel phenotypes. Chemical inhibitors of ATR kinases are actively being explored in cancer therapy, particularly for their use in tumors with high levels of RS (reviewed in ref. 21). Given that loss of INK4a/ARF is a frequent event in human cancer, our previous results raised the question of whether those tumors might not be sensitive to ATR inhibition. Consistent with this, INK4a/ARF-deficient

MEF were able to sustain growth in the presence of low doses of ATRi or HU that induced senescence on wt MEF (Fig. S1). To explore the impact of INK4a/ARF loss on limited ATR activity in vivo, we generated INK4a/ARF-deficient ATR-Seckel mice. Similar to our previous findings with shRNAs, deletion of INK4a/ARF fully rescued growth on ATR^{S/S} MEF (Fig. 3A). Again, INK4a/ARF deletion rescued the growth of ATR mutant cells without restoring ATR levels or the presence of RS (Fig. 3B–D). Surprisingly, and despite the rescue of MEF senescence, loss of INK4a/ARF did not have an impact on the viability and lifespan of ATR-Seckel mice (Fig. 3E). Accordingly, INK4a/ARF-deletion did not significantly alter the frequency of ATR-Seckel mice that reached birth, nor the apparent progeroid phenotypes that are found on ATR-Seckel mice.

One possibility to explain the lack of an impact of INK4a/ARF in the phenotypes of ATR-Seckel mice is that, in vivo, the main outcome to a severe reduction in ATR levels is cell death and not senescence. Several facts support that this is the case. First, we cannot find evidence of senescence in ATR-Seckel embryos, which is, in contrast, abundant in a mouse model with impaired Bcr1 function (Fig. S2A).²⁸ Second, and in contrast to senescence, ATR^{S/S} embryos present substantial amounts of cell death, which correlates with the severity of the progeroid phenotype in mice (Fig. S2B).^{17,29} Third, genetic deletion of the Suv39h1 histone H3 methyltransferase, which has been shown to abrogate senescence in vivo,³⁰ also fails to rescue the viability and overall phenotype of ATR-Seckel animals. Fourth, in cell types that are more prone to cell death than senescence, such as splenocytes, INK4a/ARF deletion does not modify the cytotoxic effects of ATRi (Fig. S3A). Similarly, an in vivo treatment of mice with the Chk1 inhibitor UCN-01 leads to RS and apoptosis in the thymus regardless of INK4a/ARF status (Fig. S3B). Altogether, these observations suggest that cell death rather than senescence is the main outcome to limited ATR-Chk1 function in vivo.

Contribution of INK4a/ARF to the RS-response in the context of cancer. The limited impact of INK4a/ARF deletion on ATR-Seckel mice contrasts with its role in regulating RS-induced senescence in MEF. To explain this discrepancy, we propose that INK4a/ARF-dependent senescence would be the outcome of a persistent exposure to moderate amounts of RS, such as in the case of MEF chronically exposed to low doses of HU or ATRi. In contrast, high amounts of RS would inevitably lead to cytotoxicity, given that cells would not be able to divide in the presence of unreplacated regions. This would be particularly true in the case of ATR inhibitors, where the compounds would not only perturb DNA replication, but

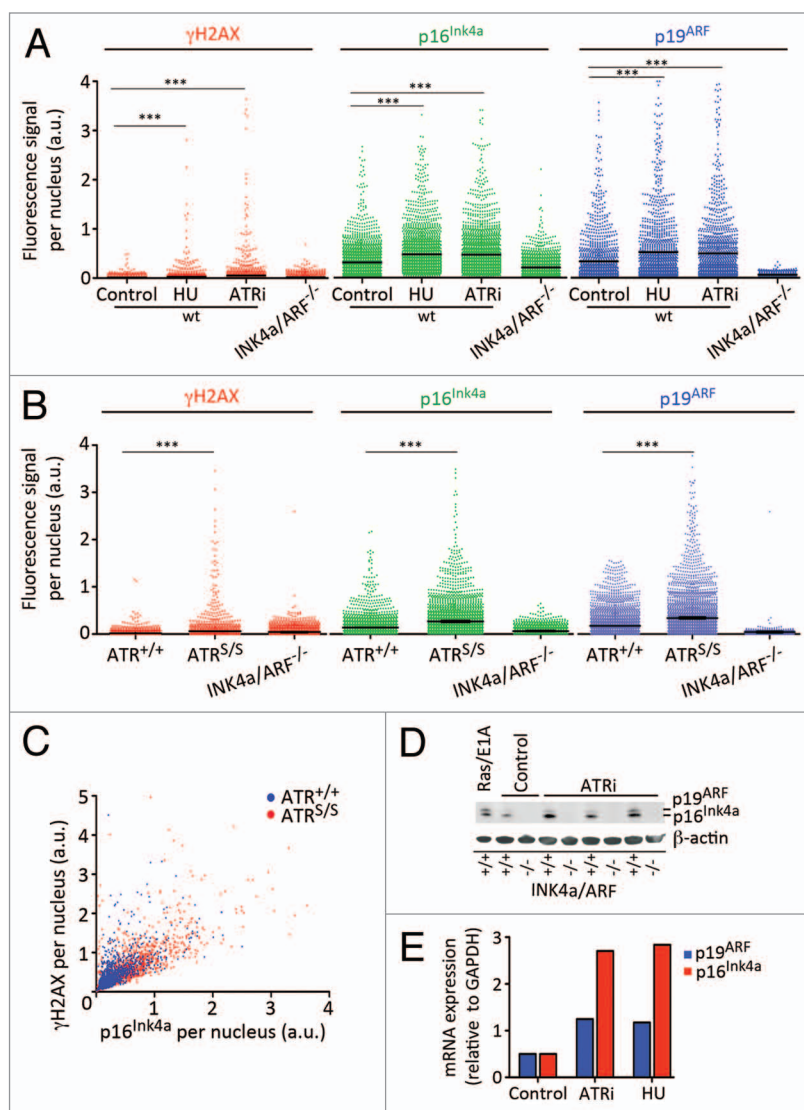


Figure 2. Activation of INK4a/ARF in response to RS. (A) HTM-mediated quantification of the nuclear levels of γ H2AX, p16^{INK4a} and p19^{ARF} in wt MEF that had been exposed for 5 d with HU (0.5 mM) and ATRi (1 μ M). INK4a/ARF^{-/-} MEF were included as a negative control. (B) HTM-mediated quantification of the nuclear levels of γ H2AX, p16^{INK4a} and p19^{ARF} in ATR^{+/+} and ATR^{S/S} MEF. INK4a/ARF^{-/-} MEF were included as a negative control. (C) 2D plot illustrating the relationship between nuclear γ H2AX and p16^{INK4a} levels found on ATR^{+/+} and ATR^{S/S} MEF. (D) Western blot analysis of p16^{INK4a} and p19^{ARF} in wt MEF that had been exposed to ATRi for 5 d (0.05, 0.1 and 0.5 μ M). MEF that had been infected with a retrovirus expressing Ras^{V12} and E1A oncogenes were used as a positive control of INK4a/ARF activation. INK4a/ARF^{-/-} MEF were included as a negative control. (E) qRT-PCR analysis of the mRNA levels of p16^{INK4a} and p19^{ARF} in wt MEF that were grown in the presence of ATRi (2 μ M) or HU (0.5 mM) for six passages. mRNA levels were normalized to the expression of GAPDH in each case. Data are representative of three independent analyses. In (A–C) at least 2,000 nuclei were quantified per condition. ***p < 0.001.

also abrogate the checkpoint activity that limits entry into mitosis with unreplacated DNA. Consistent with this model, whereas INK4a/ARF deletion facilitates the growth of MEF exposed to low doses of ATRi, it does not alter the cytotoxic effects of ATRi at higher doses of the inhibitor (Fig. S3C). This clarification is important, since it indicates that the cytotoxicity of ATR

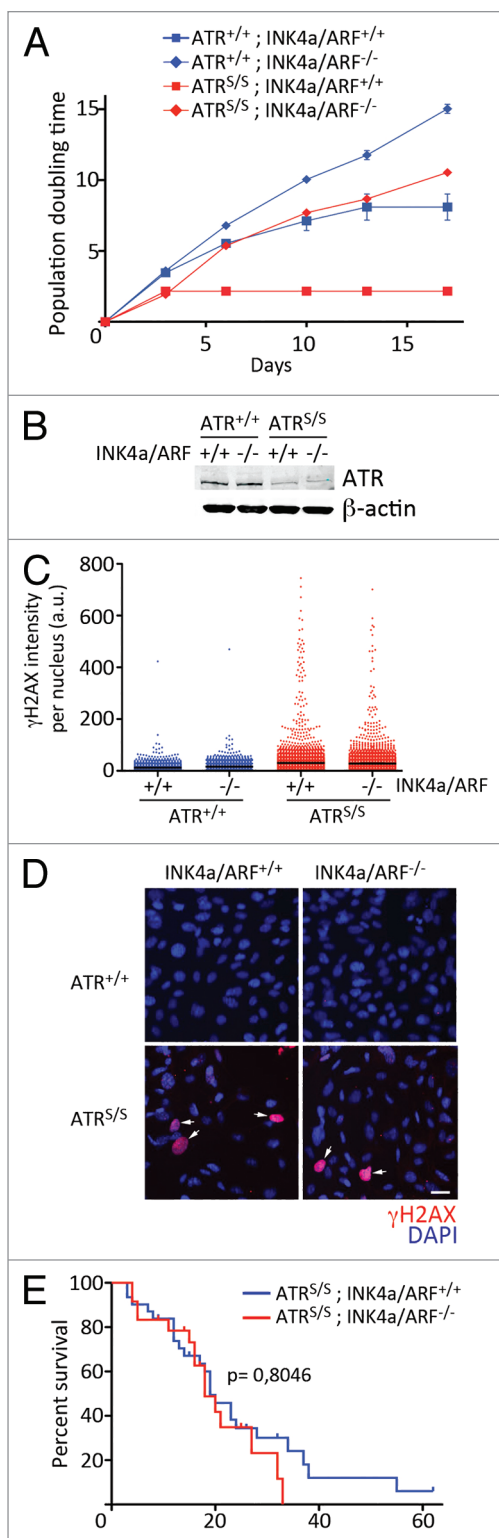


Figure 3. Rescuing senescence does not alter the lifespan of ATR-Seckel mice. (A) Growth curves of ATR^{+/+}; INK4a/ARF^{+/+}, ATR^{+/+}; INK4a/ARF^{-/-}, ATR^{S/S}; INK4a/ARF^{+/+} and ATR^{S/S}; INK4a/ARF^{-/-} MEF. Data represent mean and s.d. (n = 3). (B) Western blot analysis of ATR levels in ATR^{+/+}; INK4a/ARF^{+/+}, ATR^{+/+}; INK4a/ARF^{-/-}, ATR^{S/S}; INK4a/ARF^{+/+} and ATR^{S/S}; INK4a/ARF^{-/-} MEF. (C) HTM-mediated quantification of the levels of γH2AX per nucleus found on ATR^{+/+}; INK4a/ARF^{+/+}, ATR^{+/+}; INK4a/ARF^{-/-}, ATR^{S/S}; INK4a/ARF^{+/+} and ATR^{S/S}; INK4a/ARF^{-/-} MEF. (D) Representative examples from the HTM images for γH2AX (red) used in (C). DAPI was used (blue) to stain DNA. Scale bar (white) indicates 10 μm. All MEF data are representative of three independent analyses. (E) Kaplan-Meier analysis of the lifespan of ATR^{S/S}; INK4a/ARF^{+/+} and ATR^{S/S}; INK4a/ARF^{-/-} mice. The p value indicates the statistical significance obtained on the log-rank Mantel-Cox test.

still play a relevant role in cancer, where cells could be exposed to low but continuous levels of RS. One context where this might happen is in response to oncogenes. Oncogene-induced senescence was first observed in 1997, which already identified increased levels of p16^{INK4a} expression associated to this process.²⁵ Later works suggested that oncogene-induced senescence could be the outcome to RS,^{32,33} which would be the origin of the activated DDR that is observed in cancer.^{4,5,12} In this context, the findings we report in this manuscript could indicate that one of the roles of INK4a/ARF in cancer would be to limit the expansion of cells suffering from oncogene-induced RS. In agreement with this notion, INK4a/ARF deletion facilitates transformation with oncogenes in MEF.^{25,34}

To explore this hypothesis on a large data set of human tumors, we benefited from the recently developed “Cancer Cell Line Encyclopedia” (CCLE) project (www.broadinstitute.org/ccle/home).³⁵ The CCLE contains genome-wide gene expression and copy number variant (CNV) data for 947 human cancer cell lines of different origin. Given that CNVs are the outcome to a persistent exposure to RS,²³ we evaluated the relationship between p16^{INK4a} expression and total number of CNVs present in each of the cell lines from the CCLE. This analysis shows that cells with high numbers of CNV tend to present low levels of p16^{INK4a} in human cancer cell lines (Fig. S5). The absence of unique probes for p19^{ARF} in the CCLE data set precluded a similar analysis for this transcript. Nevertheless, p16^{INK4a} is thought to be the main contributor from the INK4a/ARF locus to tumor suppression in human cancers.⁷ The tumor suppressor activity of p16^{INK4a} is linked to the activation of the retinoblastoma (Rb) pathway. Remarkably, the only other condition besides INK4a/ARF deletion which we have found rescues senescence on ATR-Seckel MEF is the expression of a fragment of the large T antigen from SV40 virus (T121), which selectively inactivates Rb and not p53 (Fig. S6). Altogether, the data presented in this manuscript suggest that an important function of the p16^{INK4a}-Rb pathway in tumor suppression would be to limit the expansion of cells suffering from RS, revealing a new role for this pathway in safeguarding genome integrity during tumor evolution.

Discussion

p16^{INK4a} was originally described as a CDK4-interacting protein,³⁶ capable of inhibiting CDK4 and CDK6.³⁷ Soon afterwards, the locus encoding p16^{INK4a} was found to be mutated in

inhibitors in cancer would also not be affected by INK4a/ARF status. Supporting this view, the toxicity of ATRi for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines established from a mouse model of carcinogenesis driven by the K-ras oncogene³¹ was not dependent on INK4a/ARF status (Fig. S4).

Regardless of its limited impact on ATRi-mediated cytotoxicity, the RS-induced senescence pathway discovered here might

cancer.^{38,39} However, the locus also encoded a different transcript named p19^{ARF}, which shares the last two exons with p16^{INK4a}, although in a different reading frame.⁴⁰ Interestingly, p19^{ARF} is not a CDK inhibitor but rather an activator of p53. This makes the INK4a/ARF a key player in cancer, since it can activate the two main tumor suppressor pathways in human cells (p16^{INK4a}/Rb and p19^{ARF}/p53). In human cells, however, p16^{INK4a} seems to be the main contributor to tumor suppression, and cancer-associated mutations involve either the entire locus, or p16^{INK4a} alone.⁴⁰ Nevertheless, given that p19^{ARF} works through activating p53, which is a bona fide DNA damage-responsive protein, much debate has been placed over the years upon a potential role for the INK4a/ARF locus in genome maintenance.

The initial studies unlinked INK4a/ARF from the response to DNA damage.^{9,11} In contrast, the locus was shown to be activated by “oncogenic stress,” suggesting that it was only in this context where p53 activation would depend on p19^{ARF}.²⁵ In agreement with this, p19^{ARF} deficiency does not compromise radiation-induced apoptosis and p53-activation *in vivo*, but it is essential for the activation of p53 in response to oncogenic stress.¹⁰ However, several reports also indicated a potential involvement for the locus in the response to DNA damage, particularly upon the exposure to chronic doses of the genotoxic agent.^{6,41–45} One possibility to reconcile these observations emerges in the light that “oncogenic stress” could relate to the generation of chronic and low amounts of RS.^{4,5,32,33} Thus, it is possible that whereas INK4a/ARF does not play an active role in the acute response to DNA breaks, it might otherwise be relevant in the context of a persistent exposure to RS.

In agreement with this view, we show here that low amounts of RS can induce INK4a/ARF expression and INK4a/ARF-dependent senescence. From the two products of the locus, several observations suggest that p16^{INK4a} is the main contributor to this phenomenon. First, whereas INK4a/ARF deletion rescues the senescence of ATR-Seckel MEF, p53 deletion aggravates the phenotype of Seckel MEF and mice.¹⁷ Second, a fragment of the large T antigen that inactivates Rb but not p53 also rescues senescence of ATR-Seckel MEF. Consistent with this, we previously reported that Rb was activated by a continuous exposure to doxorubicin, which damages DNA during replication, and this activation was necessary to maintain a persistent cell cycle arrest of the damaged cells.⁴⁶ Finally, our meta-analysis of the CCLE data shows that p16^{INK4a} levels are particularly low on cancer cells with a high number of CNV. Altogether, we propose that the p16^{INK4a}/Rb pathway plays an active role in genome maintenance by restricting the growth of cells suffering from a persistent exposure to low amounts of RS.

At this point, it remains to be understood how a chronic exposure to low doses of RS leads to the activation of the INK4a/ARF locus. Nevertheless, several reasons suggest that this activation is not dependent on the ATR-dependent RSR. First, the activation of INK4a/ARF in response to RS demands several days, which contrasts with the immediate activation of the RSR. Second, ATR inhibition or hypomorphism lead to increased levels of p16^{INK4a} and p19^{ARF}. Finally, we previously showed that a persistent activation of ATR is able to induce senescence in an

INK4a/ARF-independent manner, which formally demonstrates that ATR-induced senescence does not require INK4a/ARF.¹⁶ If not ATR, how a chronic exposure to RS ends up activating the locus remains an open question. We should note, however, that understanding how oncogenes trigger the activation of the INK4a/ARF locus remains unsolved after many years since its discovery. Whichever the mechanism, our work reveals a new role for the INK4a/ARF locus in limiting the expansion of cells suffering from RS, which places this tumor suppressor locus as a key player in the maintenance of genomic integrity during tumor evolution.

Materials and Methods

Mice. ATR-Seckel¹⁷ and INK4a/ARF^{-/-34} mice have already been described before. Mice were kept under standard conditions at serum-pathogen free facility of the Spanish National Cancer Centre in a mixed C57BL/6-129/Sv background. All mouse work was performed in accordance with the Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research and under the supervision of the Ethics Committee for Animal Research of the Instituto de Salud Carlos III.

Cell culture. MEFs were isolated from 13.5 dpc embryos. All cells were grown in Dulbecco's minimum essential media (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and antibiotics. INK4a/Arf targeting shRNAs were previously validated in several studies.^{26,27} Retroviral infections were done using standard procedures, and infected MEFs were selected with puromycin (2 µg/ml) for 3 d. For senescence assays, MEF and embryos were fixed with 2% formaldehyde and subsequently stained with a senescence-associated β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling), following manufacturer's instructions. HU (SIGMA) and ATRi were added at the indicated concentrations and times. The ATRi has been recently described by our group.²⁰

Immunoblotting. Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA) containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Samples were resolved by SDS-PAGE and analyzed by standard western blotting techniques. Antibodies against ATR (Serotec), p16^{INK4a} (Santa Cruz p16 M-156), p19^{ARF} (Santa Cruz sc-32748) and β-actin (Sigma-Aldrich), were used. Protein blot analyses were performed on the LICOR platform (eBioscience).

High-throughput microscopy. The procedure for our HTM analyses of RS has been previously documented.²⁹ Briefly, MEF were grown on µCLEAR bottom 96-well plates (Greiner Bio-One), and immunofluorescence was performed using standard procedures. Images were automatically acquired from each well by an Opera High-Content Screening System (Perkin Elmer). A 20× or 40× magnification lens was used, and pictures were taken at nonsaturating conditions. Images were segmented using the DAPI staining to generate masks matching cell nuclei from which the mean fluorescence intensity signals were calculated. γH2AX (Upstate Biotechnology), p16^{INK4a} (Santa Cruz p16 M-156), p19^{ARF} (Santa Cruz sc-32748) as well as secondary

antibodies conjugated with Alexa 488, Alexa 594 or Alexa 647 (Molecular probes) were used.

Immunohistochemistry. Embryos and organs were fixed in formalin and embedded in paraffin for subsequent processing. Consecutive 2.5 μ m sections were treated with citrate for antigenic recovery and processed for immunohistochemistry with γ H2AX (Upstate) and activated caspase-3 (R&D Systems) antibodies. Hematoxyline was used to counterstain.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461:1071-8; PMID:19847258; <http://dx.doi.org/10.1038/nature08467>
- Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010; 40:179-204; PMID:20965415; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019>
- Satyanarayana A, Wiemann SU, Buer J, Lauber J, Dittmar KEJ, Wüstefeld T, et al. Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J* 2003; 22:4003-13; PMID:12881434; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg367>
- Gorgoulis VG, Vassiliou LVF, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005; 434:907-13; PMID:15829965; <http://dx.doi.org/10.1038/nature03485>
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005; 434:864-70; PMID:15829956; <http://dx.doi.org/10.1038/nature03482>
- te Poelc RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP, Poelc te RH. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002; 62:1876-83; PMID:11912168
- Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 2006; 127:265-75; PMID:17055429; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.003>
- Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1378:F115-77; PMID:9823374
- Kamijo T, van de Kamp E, Chong MJ, Zindy F, Diehl JA, Sherr CJ, et al. Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function. *Cancer Res* 1999; 59:2464-9; PMID:10344759
- Efeyan A, Garcia-Cao I, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M. Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 2006; 443:159; PMID:16971940; <http://dx.doi.org/10.1038/443159a>
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; 17:5001-14; PMID:9724636; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.17.5001>
- Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 2008; 319:1352-5; PMID:18323444; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1140735>
- Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:616-27; PMID:18594563; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2450>
- López-Contreras AJ, Fernandez-Capetillo O. The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2010; 9:1249-55; PMID:21036674; <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.012>
- Lukas C, Savic V, Bekker-Jensen S, Doil C, Neumann B, Pedersen RS, et al. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13:243-53; PMID:21317883; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2201>
- Toledo LI, Murga M, Gutierrez-Martinez P, Soria R, Fernandez-Capetillo O. ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks. *Genes Dev* 2008; 22:297-302; PMID:18245444; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.452308>
- Murga M, Bunting S, Montaña MF, Soria R, Mulero F, Cañamero M, et al. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet* 2009; 41:891-8; PMID:19620979; <http://dx.doi.org/10.1038/ng.420>
- Murga M, Campaner S, Lopez-Contreras AJ, Toledo LI, Soria R, Montaña ME, et al. Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18:1331-5; PMID:22120667; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2189>
- Ruzankina Y, Schoppy DW, Asare A, Clark CE, Vonderheide RH, Brown EJ. Tissue regenerative delays and synthetic lethality in adult mice after combined deletion of Atr and Tip53. *Nat Genet* 2009; 41:1144-9; PMID:19718024; <http://dx.doi.org/10.1038/ng.441>
- Toledo LI, Murga M, Zur R, Soria R, Rodriguez A, Martinez S, et al. A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18:721-7; PMID:21552262; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2076>
- Toledo LI, Murga M, Fernandez-Capetillo O. Targeting ATR and Chk1 kinases for cancer treatment: a new model for new (and old) drugs. *Mol Oncol* 2011; 5:368-73; PMID:21820372; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2011.07.002>
- Schoppy DW, Ragland RL, Gilad O, Shastri N, Peters AA, Murga M, et al. Oncogenic stress sensitizes murine cancers to hypomorphic suppression of ATR. *J Clin Invest* 2012; 122:241-52; PMID:22133876; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI58928>
- Arlt MF, Wilson TE, Glover TW. Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22:204-10; PMID:22365495; <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2012.01.009>
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997; 91:649-59; PMID:9393858; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80452-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80452-3)
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88:593-602; PMID:9054499; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- Dickins RA, McJunkin K, Hernando E, Premrsirur PK, Krizhanovsky V, Burgess DJ, et al. Tissue-specific and reversible RNA interference in transgenic mice. *Nat Genet* 2007; 39:914-21; PMID:17572676; <http://dx.doi.org/10.1038/ng2045>
- Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Cañamero M, et al. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 2009; 460:1136-9; PMID:19668188; <http://dx.doi.org/10.1038/nature08290>
- Cao L, Li W, Kim S, Brodie SG, Deng CX. Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Bcr1 full-length isoform. *Genes Dev* 2003; 17:201-13; PMID:12533509; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1050003>
- López-Contreras AJ, Gutierrez-Martinez P, Specks J, Rodrigo-Perez S, Fernández-Capetillo O. An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation. *J Exp Med* 2012; 209:455-61; PMID:22370720; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20112147>
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 2005; 436:660-5; PMID:16079837; <http://dx.doi.org/10.1038/nature03841>
- Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, et al. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 2003; 4:111-20; PMID:12957286; [http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00191-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00191-0)
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is an initial barrier in tumorigenesis imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006; 444:633-7; PMID:17136093; <http://dx.doi.org/10.1038/nature05268>
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006; 444:638-42; PMID:17136094; <http://dx.doi.org/10.1038/nature05327>

Grant Support

A.M. is funded by a Ph.D. fellowship from the Spanish Government (MINECO). A.J.L. is the recipient of a postdoctoral fellowship from the Spanish Association Against Cancer (AECC). Work in O.F. laboratory is supported by grants from the Spanish Ministry of Science (SAF2011-23753), the Association for International Cancer Research (12-0229), the Howard Hughes Medical Institute and the European Research Council (ERC-210520).

Supplemental Materials

Supplemental materials may be found here:
www.landesbioscience.com/journals/cc/article/25017

34. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85:27-37; PMID:8620534; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81079-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81079-X)
35. Garnett MJ, Edelman EJ, Heidorn SJ, Greenman CD, Dastur A, Lau KW, et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* 2012; 483:570-5; PMID:22460902; <http://dx.doi.org/10.1038/nature11005>
36. Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 1993; 7:1572-83; PMID:8101826; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.7.8.1572>
37. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366:704-7; PMID:8259215; <http://dx.doi.org/10.1038/366704a0>
38. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264:436-40; PMID:8153634; <http://dx.doi.org/10.1126/science.8153634>
39. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368:753-6; PMID:8152487; <http://dx.doi.org/10.1038/368753a0>
40. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83:993-1000; PMID:8521522; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90214-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90214-7)
41. Khan SH, Moritsugu J, Wahl GM. Differential requirement for p19ARF in the p53-dependent arrest induced by DNA damage, microtubule disruption, and ribonucleotide depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3266-71; PMID:10716710; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.7.3266>
42. Al-Mohanna MA, Al-Khalaf HH, Al-Yousef N, Aboussekhra A. The p16INK4a tumor suppressor controls p21WAF1 induction in response to ultraviolet light. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:223-33; PMID:17158160; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl1075>
43. Al-Mohanna MA, Manogaran PS, Al-Mukhalafi Z, Al-Hussein K, Aboussekhra A. The tumor suppressor p16(INK4a) gene is a regulator of apoptosis induced by ultraviolet light and cisplatin. *Oncogene* 2004; 23:201-12; PMID:14712225; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206927>
44. Sarkar-Agrawal P, Vergilis I, Sharpless NE, DePinho RA, Rünger TM. Impaired processing of DNA photoproducts and ultraviolet hypermutability with loss of p16INK4a or p19ARF. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:1790-3; PMID:15572761; <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djh307>
45. Lau WM, Ho TH, Hui KM. p16INK4A-silencing augments DNA damage-induced apoptosis in cervical cancer cells. *Oncogene* 2007; 26:6050-60; PMID:17369842; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210405>
46. Cuadrado M, Gutierrez-Martinez P, Swat A, Nebreda AR, Fernandez-Capetillo O. p27Kip1 stabilization is essential for the maintenance of cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cancer Res* 2009; 69:8726-32; PMID:19843869; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0729>